



Ana Rita Lourinho Ferreira

Licenciada em Ciências de Engenharia do Ambiente

**Potencial de plantas estuarinas na
remediação de produtos farmacêuticos e
de cuidado pessoal**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do
Ambiente, Perfil de Engenharia de Sistemas Ambientais

Orientador: Professora Doutora Alexandra de Jesus Branco
Ribeiro, CENSE, DCEA, FCT-UNL

Coorientador: Doutora Maria da Nazaré Parada Figueiredo de
Sousa Couto Alves, CENSE, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Professora Doutora Maria Júlia Fonseca de Seixas

Arguente: Doutora Cristina Marisa Ribeiro de Almeida

Vogais: Doutora Maria Nazaré Parada Figueiredo Sousa Couto Alves

Doutor Eduardo Hipólito Pires Mateus



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março de 2014



Ana Rita Lourinho Ferreira

Licenciada em Ciências de Engenharia do Ambiente

**Potencial de plantas estuarinas na
remediação de produtos farmacêuticos e
de cuidado pessoal**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do
Ambiente, Perfil de Engenharia de Sistemas Ambientais

Orientador: Professora Doutora Alexandra de Jesus Branco
Ribeiro, CENSE, DCEA, FCT-UNL

Coorientador: Doutora Maria da Nazaré Parada Figueiredo de
Sousa Couto Alves, CENSE, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Professora Doutora Maria Júlia Fonseca de Seixas

Arguente: Doutora Cristina Marisa Ribeiro de Almeida

Vogais: Doutora Maria Nazaré Parada Figueiredo Sousa Couto Alves

Doutor Eduardo Hipólito Pires Mateus

Março de 2014

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A conclusão desta dissertação não teria sido certamente possível sem o apoio incondicional de todos aqueles que estiveram comigo ao longo deste últimos 5 anos, e sobretudo ao longo destes últimos meses. A todos eles demonstro agora toda a minha gratidão.

Em primeiro lugar, à Professora Doutora Alexandra Ribeiro pela grande oportunidade de realizar a presente dissertação e confiança que depositou em mim, motivando-me sempre.

À minha co-orientadora, Doutora Nazaré Couto, não é fácil arranjar palavras para lhe agradecer. Agradeço acima de tudo a orientação e toda a ajuda, mostrando-se sempre disponível e cujo rigor contribuiu para que este trabalho fosse cada vez melhor, agradeço também a partilha de conhecimentos e interesse demonstrado.

Este trabalho também não teria sido possível sem a colaboração da FCT-UNL com o projeto ELECTROACROSS: uma abordagem integrada para encontrar novas estratégias para o desenvolvimento sustentável (FP7-PEOPLE-2010-269289-IRSES) e PTDC/ECM/111860/2009 - Electrokinetic treatment of sewage sludge and membrane concentrate: phosphorus recovery and dewatering, coordenados pela Professor Alexandra Ribeiro.

À Paula Guedes, agradeço o incansável apoio, a disponibilidade constante e todos os ensinamentos químicos e laboratoriais partilhados.

Agradeço a ambas, por fim, o bom acolhimento, a boa disposição e a amizade, que fizeram toda a diferença em tantos dias desta fase da minha vida. O vosso apoio foi imprescindível para a realização desta dissertação.

À Alice Mosca, por todos os ensinamentos analíticos e apoio.

Ao Doutor Eduardo Mateus pela disponibilidade e apoio durante o processo de análise dos resultados e partilha de conhecimentos sobre o trabalho laboratorial.

Ao Professor Doutor Marco Gomes da Silva, do Departamento de Química da FCT pelo acesso ao equipamento de cromatografia gasosa.

Aos migos, Magro, Sofia, José, Joana e Francisco pela motivação e pela amizade ao longo destes anos. Destaco a preciosa ajuda da Sílvia Dias e Vanessa Nunes, na formatação e revisão, sem vocês teria sido tudo mais difícil. Foram de facto incansáveis.

À Mila, Andreia, Luce e Jorge pelos momentos de pura descontração e apoio demonstrado.

À minha irmã e Beatriz pela compreensão e principalmente por serem uma constante motivação para mim.

Por fim, aos meus dois alicerces, os meus pais. Obrigado pelo apoio incondicional, e por fazerem sempre tudo por mim.

Resumo

Os produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal (PPCPs), são considerados poluentes emergentes no sistema aquático. A sua descarga diária e contínua nos cursos de água leva à necessidade de estudar os seus mecanismos de dispersão e potenciais formas de remediação. Este trabalho teve dois objetivos: (i) estudar a dinâmica de dispersão de três PPCPs em ambiente estuarino (água e sedimento e zona radicular de plantas estuarinas) e (ii) avaliar o potencial de duas espécies de plantas autóctones, *Spartina maritima* e *Halimione portulacoides*, para a sua remediação. Os contaminantes testados foram a cafeína (CAF), oxibenzona (HMB) e triclosan (TCS), tendo sido as amostras fortificadas com aprox. 1 mg L^{-1} de cada composto. As plantas, sedimento e água foram colhidos no estuário do Tejo, Portugal. Os ensaios decorreram em escala laboratorial e tiveram a duração de 10 dias. O primeiro ensaio foi levado a cabo em solução de *Hoagland* e o segundo ensaio em matriz ambiental real, mas com níveis diferentes de complexidade, elutriado (E) e elutriado com sedimento (ES). Os analitos da matriz líquida foram extraídos em fase sólida e o sedimento por ultrassons. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID). No ensaio em solução de *Hoagland*, apenas foram testados a HMB e o TCS, tendo-se observado que a fotodegradação é um mecanismo importante de remoção destes contaminantes, sendo mesmo o principal para o TCS. Na presença de plantas a remediação da HMB foi de 69% sendo que no controlo da fotodegradação a remediação por ação dos UV foi de 47%. No ensaio com E e ES, tentou-se minimizar os efeitos da fotodegradação. A CAF não foi remediada no ensaio E, no entanto, na simulação do meio natural (ES), as espécies de plantas mostraram potencial de remediação deste composto (53% vs. 20% do controlo). No ensaio E as plantas potenciaram a remediação de HMB e TCS em cerca de 50% e 60%, respetivamente, em relação ao controlo. No ensaio ES as percentagens de remediação foram ainda superiores, tendo estes compostos tendência para adsorver ao sedimento ou sofrerem bio-/rizorremediação. Assim, as plantas *S. maritima* e *H. portulacoides* mostraram potencial para direta ou indiretamente promoverem a remediação tanto na fração líquida (CAF) como na fração sólida (HMB e TCS), de acordo com as vias preferenciais de dispersão dos contaminantes.

Palavras-chave: plantas estuarinas, PPCPs, solução de *Hoagland*, elutriado, elutriado com sedimento.

Abstract

Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) present in the aquatic environment are regarded as emerging contaminants. Due to its daily and continuous discharge into waters there is a need to increase the knowledge about their dispersal mechanisms and potential forms of remediation. The aims of the present work were: i) to study the dispersion dynamic of three PPCPs in estuarine environment (water, sediment and roots of salt marsh plants) and ii) to evaluate the remediation potential of two salt marsh plants, *Spartina maritima* and *Halimione portulacoides*. Caffeine (CAF), oxybenzone (HMB) and triclosan (TCS) were used as contaminants and the samples were spiked with aprox. 1 mg L⁻¹ of each. The salt marsh plants, sediment and water, were collected in Tagus River Estuary, Portugal. The experiments were carried out in laboratory conditions during 10 days. The matrix for the first assay was Hoagland solution and for the second elutriate (E) and sediment soaked in elutriate (ES). The liquid phase was extracted by solid phase and sediments by sonication and quantificated by gas chromatography with flame ionization detection. For the Hoagland solution assay only HMB and TCS were tested being observed that photodegradation was an important removal mechanism. In the presence of plants the remediation of HMB was 69% whereas in the control (UV influence) it was of 47%. TCS was mostly degraded by photodegradation with its final concentration being lower than the quantification limit of the method. In the E and ES assays there was an attempt to minimize the effects of photodegradation. In the E assay CAF was not remediated but the simulation of natural environment (ES) enhanced its remediation, namely in the presence of plants (ca. 53% compared to ca. 20% in the control). The dynamic of HMB and TCS was similar. In the E assay plants revealed potential to increase the remediation of HMB and TCS in 50% and 60%, respectively, compared to the control. In the ES assay, the remediation ratio was even higher suggesting that these compounds can adsorb to sediments or be bio- / rhizoremediated. The tested salt marsh species showed potential to directly or indirectly promote the remediation of contaminants both in the liquid (CAF) and solid fraction (HMB and TCS), according to their preferential dispersion routes.

Keywords: salt marsh plants, PPCPs, *Hoagland solution*, elutriate, sediment soaked in elutriate.

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Definição do âmbito e objetivos	1
1.2. Organização da tese	2
Capítulo 2 – Enquadramento teórico	3
2.1. Fitorremediação	3
2.1.1. Processos de fitorremediação	4
2.1.1.1. Fitoextração/fitoacumulação	5
2.1.1.2. Fitoestabilização/fitosequestração	5
2.1.1.3. Fitoestimulação/rizodegradação	7
2.1.1.4. Fitovolatilização	7
2.1.1.5. Fitodegradação/fitotransformação	8
2.2. Plantas halófitas	9
2.2.1. <i>Halimione portulacoides</i>	10
2.2.2. <i>Spartina maritima</i>	11
2.3. Análise SWOT (<i>strenghts, weaknesses, opportunities, threats</i>)	12
2.4. Zonas húmidas	15
2.5. Produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal	17
2.5.1. Características físico-químicas	17
2.5.1.1. Características dos PPCPs em análise	19
2.5.2. Presença de PPCPs no ambiente	21
2.5.2.1. Efeitos no ambiente	24
2.5.2.2. Destino de PPCPs no ambiente	25
2.6. Determinação de PPCPs	27
2.6.1. Métodos de extração	27
2.6.1.1. Extração em fase sólida	27
2.6.2. Métodos de análise	30
2.6.2.1. Cromatografia gasosa	30
Capítulo 3 – Materiais e métodos	33
3.1. Avaliação de potencial de fitorremediação de plantas estuarinas	33
3.1.1. Desenho experimental	33
3.1.2. Descrição do local de amostragem	34
3.1.3. Procedimento de colheita e preparação dos exemplares	34
3.1.1.1. Ensaios de remoção de PPCPs	37
3.1.3.2. Ensaio em solução de <i>Hoagland</i>	37
3.1.3.3. Ensaio em elutriado e elutriado com sedimento	39

3.2. Métodos analíticos	41
3.2.1. Reagentes e material	41
3.2.2. Teor de clorofilas e carotenoides.....	41
3.2.3. Determinação de PPCPs	42
3.2.3.1. Preparação das amostras	42
3.2.3.2. Extração das amostras líquidas.....	42
3.2.3.3. Extração de amostras sólidas	43
.....	44
3.1.3.4. Análise de PPCPs.....	44
3.2.3.5. Ferramentas de validação	45
3.3. Análise estatística	46
Capítulo 4 - Resultados e discussão	48
4.1. Determinação de PPCPs.....	48
4.1.1. Ferramentas de validação	48
4.1.1.1. Calibração.....	48
4.1.1.2. Limites de detecção e quantificação	50
4.1.1.3. Recuperação do método	50
4.2. Ensaio em solução de <i>Hoagland</i>	50
4.2.1. Variação de pH e pigmentos fotossintéticos.....	50
4.3. Ensaio em elutriado e elutriado com sedimento	53
4.3.1. Caracterização do sedimento e água de estuário.....	53
4.3.2. Variação de pH e pigmentos fotossintéticos.....	53
4.3.3. Remediação na matriz elutriado	56
4.3.4. Remediação na matriz elutriado com sedimento.....	57
Capítulo 5 – Conclusões	65
Capítulo 6 - Perspetivas futuras	67
Referências bibliográficas	69
ANEXO.....	77

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Possíveis destinos dos poluentes durante a fitorremediação (Adaptado de Pilon-Smits, 2005).	4
Figura 2.2 - Exemplares de <i>Halimione portulacoides</i> em ambiente natural no mês de Outubro no sapal do rio Coina, estuário do Tejo.	11
Figura 2.3 - Exemplares de <i>Spartina maritima</i> em ambiente natural no mês de Outubro no sapal do rio Coina, estuário do Tejo.	12
Figura 2.4 - Mecanismos de remoção de fármacos em zonas húmidas (Fonte: Zhang <i>et al.</i> , 2013a).	16
Figura 2.5 - Concentrações totais de PPCPs medidas num afluente (Fonte: Sun <i>et al.</i> , 2013).	22
Figura 2.6 - Eficiências médias de remoção de PPCPs (barras de erro representam o desvio padrão) (Fonte: Sun <i>et al.</i> , 2013).	23
Figura 2.7 - Possíveis rotas de fármacos e seus metabolitos no ambiente (Adaptado de Bila and Dezotti, 2003).	26
Figura 2.8 – Cartucho HLB® 6cc (200 mg) da Waters (Saint-Quentin En Yvelines Cedex, France) para SPE.	27
Figura 2.9 - Etapas envolvidas no processo de SPE (Adaptado de Sigma-Aldrich Co., 1998).	29
Figura 2.10 - Cromatografia gasosa (Fonte: http://www.chromedia.org/).	30
Figura 3.1 - Desenho experimental de ensaios de remoção de PPCPs.	33
Figura 3.2 - Enquadramento geográfico do sapal do rio Coina e vista de parte do sapal.	34
Figura 3.3 -Exemplares frescos de <i>H. portulacoides</i> (a) e <i>S. maritima</i> (b).	35
Figura 3.4 - Exemplares de <i>S. maritima</i> e <i>H. portulacoides</i> para o ensaio A.	36
Figura 3.5 – <i>S. maritima</i> e <i>H. portulacoides</i> agrupadas para o início do ensaio B.	36
Figura 3.6 - Exemplares de <i>S.maritima</i> , <i>H. portulacoides</i> e respetivos controlos no ensaio A.	38
Figura 3.7 - Raízes de <i>H. portulacoides</i> (a) e <i>S. maritima</i> (b) em solução de Hoagland (ensaio A).	38
Figura 3.8 - Exemplo de tratamento em E (a) e ES (b).	39
Figura 3.9 – Set-up experimental do ensaio B.	40
Figura 3.10 - Extratos de planta em 80% de acetona (a) e espectrofotómetro (b).	42
Figura 3.11 - Esquema sequencial do procedimento analítico.	42
Figura 3.12 - Extração em fase sólida (a) e extração em fase sólida com <i>manifold</i> (b).	43
Figura 3.13 – Amostras de sedimento para secar ao abrigo da luz.	43
Figura 3.14 - Sedimento com peso constante para extração (a), ultra-sons (b) e concentração de amostras em <i>rotavapor</i> (c).	44
Figura 3.15 - GC-FID ThermoQuest Trace 20000.	45
Figura 4.1 - Exemplo de um cromatograma do padrão de 80 ppm (CAF, HMB, TCS).	48
Figura 4.2 - Reta de calibração da CAF.	49

Figura 4.3 - Reta de calibração da HMB.....	49
Figura 4.4 - Reta de calibração do TCS.....	49
Figura 4.5 - Teor de clorofilas (a, b) e carotenóides (valores médios e desvio padrão, n = 3) ao fim de 10 dias de ensaio em solução de <i>Hoagland</i> (ensaio A) para cada espécie de planta e respetivo controlo. As mesmas letras significa que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) em comparação com o respetivo controlo.	51
Figura 4.6 - Percentagem normalizada ao controlo, de HMB e TCS presente na solução de <i>Hoagland</i> (ensaio A) ao fim de 10 dias (n=3). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).	52
Figura 4.7 - Teor de clorofilas (a, b) e carotenóides (valores médios e desvio padrão, n = 3) ao fim de 10 dias no ensaio B para a espécie <i>S. maritima</i> . As mesmas letras significa que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) para o mesmo ensaio (E e ES).	54
Figura 4.8 - Teor de clorofilas (a, b) e carotenóides (valores médios e desvio padrão, n = 3) ao fim de 10 dias no ensaio B para a espécie <i>H. portulacoides</i> . As mesmas letras significa que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) para o mesmo ensaio (E e ES).	54
Figura 4.9 - Massa (valor médio e desvio padrão, n=3) de contaminante presente na fase líquida em E e ES ao fim de 10 dias no ensaio B. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para o mesmo ensaio (E e ES).	55
Figura 4.10 - Massa (valores médios e desvio padrão, n=3) de contaminantes exsudados/dessorvidos pela raiz em elutriado por <i>S. maritima</i> e <i>H. portulacoides</i> no ensaio B.	57
Figura 4.11 - Massa (valor médio e devio padrão, n=3) de contaminante (CAF, HMB, TCS) presente no sedimento após 10 dias no ensaio B.	59
Figura 4.12 - Cromatogramas obtidos por GC-TOF/MS para uma amostra de sedimento (a) com extração de ião (à esquerda): 194 correspondente à CAF, 277 à HMB, 288 ao TCS e respetivos espectros de massa (à direita).	60
Figura 4.13 - Massa (valores médios e desvio padrão, n=3) de contaminante exsudados/dessorvidos da raiz no ensaio em elutriado com sedimento (ensaio B) por <i>S. maritima</i> e <i>H. portulacoides</i>	61
Figura 4.14 - Cromatogramas obtidos por GC-TOF/MS para uma amostra de exsudação/dessorção da planta (a) com extração de ião (à esquerda): 194 correspondente à CAF, 277 à HMB e 288 ao TCS e respetivos espectros de massa (à direita).	63

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Análise SWOT.....	14
Tabela 2.2 - Propriedades físico-químicas da cafeína, oxibenzona e triclosan.....	21
Tabela 2.3 - Concentrações de cafeína, TCS e HMB nas águas.....	24
Tabela 3.1 - Massa total de plantas por tratamento na presença de contaminantes (1, 2 e 3) e controlo de vitalidade (4, 5 e 6) no ensaio A	35
Tabela 3.2 - Massa total de plantas por tratamento na presença de contaminantes (1 - 6) e controlo de vitalidade (7 - 9) no ensaio B.....	36
Tabela 3.3 - Parâmetros experimentais do ensaio A	39
Tabela 3.4 - Parâmetros experimentais no ensaio B	40
Tabela 3.5 - Parâmetros do método em GC para determinação de PPCPs	45
Tabela 4.1 - Características da reta de calibração para os três.....	50
Tabela 4.2 - Limite de deteção e limite de quantificação em GC-FID para CAF, HMB e TCS	50

Acrónimos e abreviaturas

BTEX	benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno
CAF	cafeína
CO ₂	dióxido de carbono
COV	composto orgânico volátil
EPA	agência de proteção ambiental dos Estados Unidos
ETA	estação de tratamento de águas
ETAR	estação de tratamento de águas residuais
FID	detetor de ionização de chama (<i>flame ionization detector</i>)
GC	cromatografia gasosa (<i>gas chromatography</i>)
GC–TOF/MS	espectrometria de massa com analisador por tempo de voo
MS	detetor por espectrometria de massa
<i>H</i>	constante de <i>Henry</i>
HAP	hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HMB	oxibenzona
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
Log K _{oc}	coeficiente de partição do carbono orgânico
Log D _{ow}	coeficiente de distribuição octanol-água
Log K _{ow}	coeficiente de partição octanol-água
MM	massa molar
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.e.	por exemplo
Pa	Pascal
pH	potencial de hidrogénio
pKa	constante de acidez
PPCP	produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal (<i>pharmaceuticals and personal care products</i>)
S _A	solubilidade
SPE	extração em fase sólida (<i>solid phase extraction</i>)
SWOT	forças, fraquezas, oportunidades, ameaças (<i>strenghts, weaknesses, opportunities, threats</i>)

TBT	tributil-estanho
TCS	triclosan
UV	radiação ultravioleta
UV-A	radiação ultravioleta tipo A
UV-B	radiação ultravioleta tipo B

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Definição do âmbito e objetivos

Devido à importância dos recursos hídricos no planeta, o tratamento e proteção das águas existentes é um tema atual e de extrema importância. Diariamente são descarregados para o sistema aquático, um conjunto de contaminantes orgânicos, destacando-se os produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal, designados em inglês por *pharmaceuticals and personal care products* (PPCPs), pelas características que apresentam e elevado consumo em todo o mundo. Estes produtos são consumidos por razões estéticas, ou para prevenir, diagnosticar, mitigar ou curar doenças em seres vivos (Zhang *et al.*, 2013a). Devido ao uso generalizado e à sua remoção geralmente ineficiente dos efluentes, em estações de tratamento de águas residuais (ETARs), tem havido registo da ocorrência frequente destes produtos no meio aquático, solos e sedimentos. Por isso, o estudo ambiental destes compostos encontra-se entre as linhas prioritárias de investigação das principais agências dedicadas à proteção da saúde pública e do meio ambiente, tais como, a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Agência de Proteção do Meio Ambiente dos Estados Unidos (USEPA) e a Comissão Europeia (Barceló, 2008).

Os estuários, devido à sua localização geográfica e características físicas, são ecossistemas que prestam importantes serviços e que muitas vezes se encontram em risco devido, por exemplo, às descargas de águas residuais municipais e industriais nos cursos de água. Pelas razões mencionadas, é cada vez mais importante melhorar as técnicas de controlo de qualidade das águas e estudar metodologias de remediação mais eficazes que permitam remover os contaminantes presentes nos cursos de água, mesmo que em quantidades vestigiais, e, por consequência, evitar a sua acumulação ou promover a sua remediação nos estuários (para os contaminantes já acumulados). A fitorremediação surge assim, como técnica de remediação *in situ*, com a finalidade de conservar os recursos e minimizar os impactos ambientais.

A presente dissertação propõe-se a responder às seguintes questões:

- *Qual a rota que os contaminantes podem seguir à chegada ao estuário (fase aquosa e sedimento)? Poderão as plantas autóctones potenciar a sua remediação?*

Para responder a estas questões, simulou-se o sistema estuarino (à exceção das variações de maré), de modo a estudar a dinâmica de dispersão de três PPCPs: cafeína (CAF), triclosan (TCS) e oxibenzona (HMB), nomeadamente na compartimentação em matrizes estuarinas:

água, sedimento e planta - *Spartina maritima* e *Halimione portulacoides*. Em simultâneo, também foi explorado o potencial destas espécies para promover a remediação dos PPCPs em análise. Estes compostos foram selecionados com base na ocorrência em águas superficiais e nas suas propriedades físico-químicas (p.e. Log K_{ow}).

Com este propósito foram executados dois ensaios experimentais em escala laboratorial com a duração de 10 dias. O primeiro ensaio foi realizado numa solução sintética de nutrientes, denominada de solução de *Hoagland* com o objetivo de perceber os mecanismos fundamentais de remoção dos contaminantes, nas condições em análise, uma vez que as potenciais interações entre a matriz real (sedimento e água estuarinos) e os compostos de interesse são minimizadas, só havendo trocas entre a solução hidropónica e a planta. O segundo ensaio foi constituído por dois conjuntos: elutriado (E) e elutriado com sedimento (ES). O ensaio em elutriado com sedimento, permitiu simular alguns dos processos que poderão ocorrer em ambiente natural, e o ensaio em elutriado, permitiu a reprodução de um meio mais simplificado (sem sedimento), para facilitar a interpretação dos resultados.

Os analitos na matriz líquida foram extraídos por extração em fase sólida e no sedimento por extração em ultra-sons. Todas as amostras foram quantificadas por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama e para identificação dos compostos utilizou-se cromatografia gasosa com detetor de espectrometria de massa.

1.2. Organização da tese

A presente dissertação encontra-se dividida nos seguintes capítulos:

1. Introdução: apresentação do problema e sua relevância, os principais objetivos e estrutura de dissertação;
2. Enquadramento: revisão bibliográfica
3. Materiais e métodos: descrição dos materiais e metodologias aplicadas na amostragem, extração, análise, identificação e métodos de tratamento de dados;
4. Resultados e discussão: apresentação e análise dos resultados obtidos, formulação de hipóteses e sua discussão;
5. Conclusões: resumo dos principais resultados e sugestão de futuras linhas de investigação;
6. Referências.

Capítulo 2 – Enquadramento teórico

2.1. Fitorremediação

A poluição ambiental através de compostos orgânicos é um problema global. Desta forma, o desenvolvimento de tecnologias de remediação eficientes que causem o mínimo de danos ao ambiente, assume uma grande importância (Abhilash *et al.*, 2009).

A expressão “remediação de solos contaminados” é aplicado como um conjunto de práticas e/ou processos que visam a atenuação ou correção do impacto ambiental causado por agentes contaminantes. O seu objectivo será garantir a funcionalidade do ecossistema, bem como evitar a expansão da contaminação. Inúmeros investigadores e organizações, têm vindo a propor alternativas de remediação menos invasivas, em contraste com as abordagens tradicionais, a fim de conservar os recursos e de minimizar os impactos ambientais (USEPA, 2008).

A utilização de plantas para remediar sistemas contaminados, não é uma técnica recente, tendo sido desenvolvida na década de cinquenta. No entanto, o termo fitorremediação surgiu em 1980 e a expansão nesta área só começou na década de noventa (McCutcheon and Schnoor, 2003, Cunningham and Berti, 1993).

A fitorremediação pode ser definida como uma técnica que utiliza a vegetação para o tratamento *in situ* de solos, sedimentos e água contaminados (Pereira *et al.*, 2007; Pilon-Smits, 2005; Newman and Reynolds, 2004; Meagher, 2000; Salt *et al.*, 1998). É aplicável em locais com contaminantes orgânicos e inorgânicos, que podem ser alcançados pelas raízes das plantas e sujeitos a vários mecanismos: sequestrados, degradados, imobilizados, ou metabolizados no local, seja no interior ou no exterior da planta, dependendo do tipo de contaminante (Susarla *et al.*, 2002; Dietz and Schnoor, 2001).

Embora a fitorremediação tenha sido primeiramente aplicada na remoção de poluentes inorgânicos do solo, esta tecnologia tem provado ser eficaz no tratamento de poluentes orgânicos. De entre estes compostos, destacam-se os solventes clorados, hidrocarbonetos derivados de petróleo nomeadamente hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), pesticidas e herbicidas, elementos químicos radioativos, resíduos orgânicos industriais e explosivos (Couto *et al.*, 2011; Pilon-Smits, 2005; Newman and Reynolds, 2004; Williams, 2002; Meagher, 2000; Salt *et al.*, 1998).

2.1.1. Processos de fitorremediação

Os poluentes podem ser remediados em plantas através de vários processos biofísicos e bioquímicos (ver Figura 2.1).

- Fitoextração ou fitoacumulação;
- Fitoestabilização ou fitosequestração;
- Fitoestimulação ou rizodegradação;
- Fitovolatilização;
- Fitodegradação ou fitotransformação.

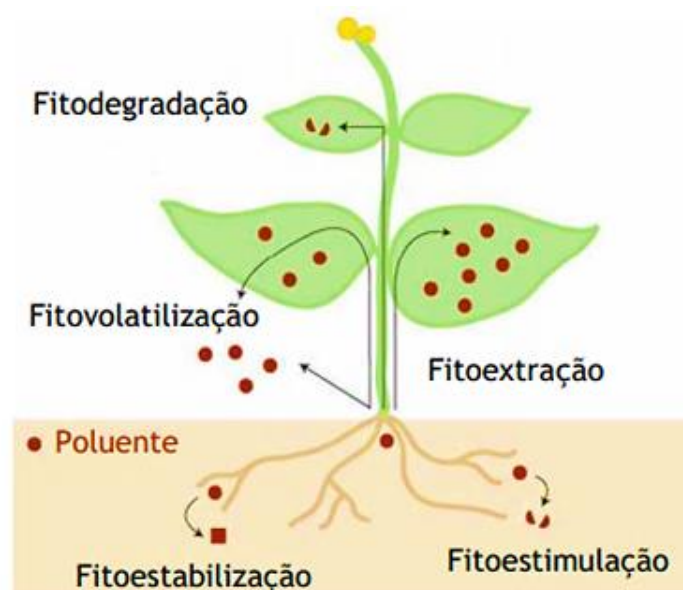


Figura 2.1 - Possíveis destinos dos poluentes durante a fitorremediação (Adaptado de Pilon-Smits, 2005).

Em cada um dos processos mencionados anteriormente existem vários mecanismos envolvidos. Tais mecanismos incluem a extração dos contaminantes do local contaminado, concentração no tecido vegetal, degradação por vários processos bióticos e abióticos, volatilização ou transpiração de compostos voláteis, imobilização ou degradação dos contaminantes na zona da raiz (USEPA, 2000). É de salientar que os diversos processos de fitorremediação, não são processos isolados e podem ocorrer simultaneamente, como por exemplo, a ocorrência de acumulação, estabilização e posterior volatilização de compostos orgânicos (Hansen *et al.*, 1998 *in* Pilon-Smits, 2005).

Em seguida serão explicados os processos ilustrados na Figura 2.1.

2.1.1.1.Fitoextração/fitoacumulação

A fitoextração envolve a absorção dos contaminantes presentes no solo, sedimentos ou água, a partir das raízes e a translocação dos mesmos para os tecidos aéreos da planta (Salt *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 1995 in McCutcheon and Schnoor, 2003). É um processo muito aplicado em contaminantes metálicos, como o cádmio, níquel, cobre, zinco e chumbo, embora também possa ser utilizado para compostos orgânicos (Susarla *et al.*, 2002).

A hiperacumulação é uma característica que algumas plantas apresentam e que envolve a absorção e acumulação de metais nos tecidos aéreos da planta, correspondente a 0,1% por peso seco da planta (Brooks *et al.*, 1977 in McCutcheon and Schnoor, 2003).

Um estudo realizado por Sousa *et al.* (2008), no estuário do Tejo, concluiu que todas as partes da espécie *H. portulacoides* retêm metais. No entanto, estes compostos foram detetados principalmente na parede celular (65% raízes, 55% nos caules e 53% nas folhas), sendo a concentração no compartimento intracelular muito inferior (21% em raízes, 25% em caules e 32% nas folhas). Ou seja, os metais são preferencialmente armazenados/sequestrados em vacúolos e na parede celular, fora dos locais onde ocorrem as principais atividades metabólicas, tais como, citoplasma, cloroplastos e mitocôndrias. Considerando estes dados, pode-se afirmar que os mecanismos de desintoxicação e compartimentação são cruciais para *H. portulacoides*, e para outras plantas de estuário, permitindo que a(s) espécie(s) suporte níveis elevados de metais pesados no ambiente sedimentar, sem sofrer sintomas de toxicidade (Sousa *et al.*, 2008).

Uma das principais preocupações em relação a este processo, é o destino a dar às plantas após a acumulação de metais. Segundo Sas-Nowosielska *et al.* (2004), a incineração é a estratégia mais viável já que mostra ser ambiental e economicamente aceitável, podendo a energia libertada ser utilizada para aquecimento e produção de energia. Outros autores consideram a pirólise das plantas como uma fonte de metais, desde que se considere a eventual separação do metal numa unidade de processamento de metais convencional (Koppolu *et al.*, 2004).

2.1.1.2.Fitoestabilização/fitosequestração

A fitoestabilização ou fitosequestração refere-se à capacidade que algumas plantas possuem em reduzir a mobilidade e a migração dos contaminantes, assim como, a sua disponibilidade no solo, fazendo com que estes permaneçam no local. Por isso, ao contrário do que acontece na fitoextração, as plantas ideais para a fitoestabilização, são as que não tendem a translocar os contaminantes para os tecidos aéreos, nem a mobilizar os contaminantes (p.e. a partir da

produção natural de agentes tensioativos) e toleram níveis de contaminação mais elevados, perto de limites de risco (McCutcheon and Schnoor, 2003).

Assim, a fitoestabilização pode ser definida como (USEPA, 2000):

- A imobilização de um contaminante no solo através da adsorção ou absorção e acumulação pelas raízes, ou através de precipitação na zona radicular da planta reduzindo a mobilidade e biodisponibilidade prevenindo a migração dos contaminantes para águas subterrâneas (lixiviação);
- O uso das plantas e as suas raízes (cobertura vegetal) para controlar a erosão eólica e hídrica, evitando assim, a dispersão de contaminantes.

A precipitação do contaminante na zona radicular da planta, deriva de processos microbiológicos e reações químicas que ocorrem nas raízes, e/ou por alterações no ambiente do solo tais como pH.

A fitoestabilização é aplicada especialmente em locais contaminados por metais pesados, como o chumbo, cádmio, zinco e arsénio, onde a melhor alternativa é, frequentemente, manter o contaminante no local, de modo a evitar uma maior biodisponibilidade durante a ação de remoção e a minimizar os distúrbios nos ecossistemas (Susarla *et al.*, 2002). A *S. maritima* é um exemplo de uma espécie de planta característica de zonas húmidas que possui capacidade de retenção e fitoestabilização de metais nos sedimentos (Reboreda and Caçador, 2007a).

Segundo Kalin (2002), a biomineralização é a chave para a estabilização de metais. Este é o processo através do qual organismos vivos produzem minerais, muitas vezes para endurecer ou tornar rígidos os tecidos existentes, de modo a que o contaminante não se disperse, imobilizando-o.

Quanto aos contaminantes orgânicos, a fitoestabilização baseia-se em processos de sequestração. Este processo inclui a humificação, ligações covalentes e irreversíveis de contaminantes por bactérias do solo e a lenhificação (Cunningham and Ow, 1996).

No processo de formação de húmus, denominado de humificação, as enzimas de plantas e de microrganismos ligam os contaminantes ao húmus do solo, reduzindo a biodisponibilidade do contaminante. Na lenhificação, ocorre a imobilização do contaminante em lenhinas das paredes celulares (Schnoor *et al.*, 1995).

No entanto, como os contaminantes permanecem no local, a vegetação e o solo podem necessitar de um longo período de monitorização, de modo a impedir a solubilidade dos

contaminantes e consequentemente, uma futura lixiviação dos mesmos, ao longo do perfil de solo (USEPA, 2000).

2.1.1.3.Fitoestimulação/rizodegradação

Neste processo o contaminante não é absorvido pela planta. A degradação ocorre fora da planta, a partir de interações, na rizosfera, entre a planta e os microorganismos associados, que utilizam carbono dos contaminantes orgânicos como fonte de energia (Pilon-Smits, 2005, McCutcheon and Schnoor, 2003).

A libertação de exsudados radiculares por parte da planta, provoca o estímulo da atividade microbiana que atua na degradação do composto no solo. Os exsudados libertados pelas raízes servem de recursos para fungos heterotróficos e bactérias, que ampliam a área de degradação ao redor da raiz, e utilizam os metabolitos exsudados pela planta como fonte de carbono e energia (Pilon-Smits, 2005). A composição da comunidade microbiana da rizosfera depende da espécie da planta, da idade, do tipo de raiz, bem como do tipo de solo (Anderson *et al.*, 1993 *in* McCutcheon and Schnoor, 2003).

Embora possa promover a transformação de vários metais (p.e. selênio e mercúrio), a fitoestimulação é mais aplicada aos contaminantes orgânicos e organometálicos (Dietz and Schnoor, 2001). Esse processo tem sido útil para a limpeza de ambientes contaminados por compostos orgânicos, tais como substâncias químicas aromáticas hidrofóbicas (HAPs, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos - BTEX) e compostos derivados dos fenóis, em locais onde a contaminação não é profunda e portanto está próxima do campo de ação da planta, ou seja, das raízes (Dietz and Schnoor, 2001).

2.1.1.4.Fitovolatilização

A fitovolatilização oferece a possibilidade de remoção completa de um contaminante sob a forma gasosa/vapor (USEPA, 2000).

O processo consiste na absorção do contaminante pela planta e na sua libertação para a atmosfera na forma volátil pelas folhas ou raízes, podendo ou não sofrer modificações nas suas propriedades químicas. Os contaminantes absorvidos podem ser metabolizados em formas menos tóxicas, e uma vez na atmosfera, podem sofrer a ação de processos naturais, tais como, a fotodegradação. (USEPA, 2000).

É um processo que tem efetividade na remoção de compostos orgânicos voláteis (COVs), incluindo os BTEX e também na remoção de alguns metais que apresentam fase de vapor. Pode ser aplicado no tratamento de águas subterrâneas, sedimentos e lamas, porém os solos

devem oferecer condições adequadas em relação à quantidade de água para que os contaminantes possam ser absorvidos (Pilon-Smits, 2005).

Torna-se necessário que se considerem os níveis e as propriedades tóxicas dos gases/vapores libertados por este processo, porque ao serem introduzidos na atmosfera poderão agir como outro fator de risco ambiental (McCutcheon and Schnoor, 2003; Cunningham and Ow, 1996).

2.1.1.5. Fitodegradação/fitotransformação

A fitodegradação ou fitotransformação traduz-se na metabolização de um contaminante a um composto não tóxico, ou de menor toxicidade, para a planta e para o ambiente (Salt *et al.*, 1998).

A metabolização consiste na transformação dos compostos, nas células das plantas, antes de serem isolados em vacúolos ou de se ligarem a estruturas celulares insolúveis, como a lenhina (Salt *et al.*, 1998).

Após a absorção, os contaminantes orgânicos são degradados ou mineralizados dentro das células vegetais por enzimas específicas, destacando-se as nitroredutases (degradação de nitro-aromáticos), desalogenases (catalisadores da degradação de compostos clorados) e lacases (degradação de anilinas) ou libertados em forma de complexos enzimáticos pelas raízes (Cunningham and Ow, 1996).

A absorção e distribuição dos contaminantes dependem das propriedades físicas e químicas do composto, das características ambientais, e do metabolismo da planta que consiste numa série de reações. Tais reações podem incluir a (i) transformação (oxidações, reduções, hidrólise), (ii) conjugação dos metabolitos (com glutathione, açúcares, aminoácidos) e (iii) sequestro ou compartimentação dos produtos conjugados em vacúolos ou ligados nas paredes celulares e lenhina (McCutcheon and Schnoor, 2003; Susarla *et al.*, 2002; Cunningham and Berti 1993).

A fitodegradação é indicada para o tratamento de solos, sedimentos, lamas e águas subterrâneas e, em alguns casos, de águas superficiais. Pode ser uma alternativa no tratamento de locais com níveis de contaminação não suportados por microorganismos, uma vez que algumas espécies de plantas podem crescer em solos estéreis e com níveis elevados de contaminação. Esta técnica é ideal para poluentes orgânicos que são móveis em plantas, tais como, herbicidas e hidrocarbonetos (USEPA, 2000).

2.2. Plantas halófitas

Para que a fitorremediação seja bem-sucedida é necessário que as espécies de plantas selecionadas apresentem uma boa capacidade de absorção, sistema radicular profundo e denso, capacidade de se desenvolver em vários ambientes, taxa de crescimento e produção de biomassa elevada (nomeadamente para os metais), fácil colheita e resistência a pragas e doenças (Douglas and Rats, 2007; Pilon-Smits, 2005). As plantas halófitas podem apresentar algumas destas características, surgindo assim, com potencial para a fitorremediação. Vários estudos utilizando diferentes espécies de plantas halófitas, têm vindo a apontar que este tipo de plantas pode influenciar as eficiências de remoção de PPCPs (Zarate Jr. *et al.*, 2012; Hijosa-Valsero *et al.*, 2010).

As plantas classificadas como halófitas são encontradas em habitats marinhos, sapais, mangais da zona tropical e desertos salinos (Martins, 2011).

A definição de plantas halófitas ainda não é consensual, no entanto, sabe-se que este tipo de planta apresenta adaptações morfológicas e fisiológicas, que lhe permite sobreviver em habitats com valores de salinidade próximos da água do mar ou superiores. Estas adaptações permitem a prevenção dos efeitos do cloreto de sódio (NaCl) na planta, nomeadamente da inibição da atividade enzimática por contacto com este sal e a diminuição das diferenças no potencial osmótico durante a inundação da maré (Silva, 2000 *in* Martins, 2011).

De entre as plantas halófitas existentes encontram-se a *H. portulacoides* e a *S. maritima*. Estas duas espécies encontram-se amplamente distribuídas nos sapais do rio Tejo, ocupando diferentes zonas do estuário (Duarte *et al.*, 2007). A *S. maritima* encontra-se distribuída pelas zonas mais baixas, enquanto que a *H. portulacoides* coloniza as zonas centrais. Este facto é importante porque aumenta as diferenças entre as características químicas do sedimento, relacionada com os diferentes tempos de submersão (Reboreda and Caçador, 2007a).

Um estudo realizado por Reboreda e Caçador (2007a) demonstrou que os sedimentos entre as raízes de *S. maritima* concentram uma maior quantidade de metais, comparativamente aos sedimentos entre as raízes de *H. portulacoides*. Pelo contrário, quando analisados os tecidos das plantas, a *H. portulacoides* apresentou uma maior concentração de metais nos tecidos do que a *S. maritima*. Assim, concluíram que a utilização da *S. maritima* e *H. portulacoides* para fitorremediação de sapais poluídos poderá ser aplicada segundo duas perspetivas diferentes: a fitoestabilização dos metais nos rizossedimentos, ou a fitoextração por acumulação nos tecidos das partes aéreas da planta, seguida de remoção da planta. Isto porque metais contidos nas partes aéreas das plantas são mais suscetíveis de voltar ao sistema, através de excreção pelas folhas ou decomposição dos resíduos da planta, podendo atuar como uma

fonte de metais para o sistema (Reboreda e Caçador, 2007a). Através deste estudo, efetuado com contaminantes inorgânicos, pode-se concluir que, para a mesma tecnologia de remediação, as espécies de plantas podem atuar de forma diferente.

Carvalho *et al.* (2010) referem a importância das plantas halófitas nos sapais, como a *H. portulacoides* e *S. maritima*, na remediação de solos e sedimentos poluídos por tributil-estanho (TBT). Segundo estes autores, os sedimentos colonizados por *S. maritima* não continham TBT e os colonizados por *H. portulacoides* apresentaram níveis de TBT menores que 30% em comparação com solos sem vegetação na mesma área. A *H. portulacoides* mostrou ainda capacidade para estimular o crescimento bacteriano da rizosfera.

O ambiente estuarino é caracterizado por ter variações diárias de temperatura, salinidade e turvação, e por ser dominado por material sedimentar fino. Tais características apresentam desafios para a fisiologia dos organismos vivos, a que poucos são capazes de se adaptar (McLusky and Elliot, 2004). Em seguida, são apresentadas algumas características das plantas que foram utilizadas na presente dissertação.

2.2.1. *Halimione portulacoides*

A *H. portulacoides* é um arbusto ou subarbusto perene, prostrado-farináceo, lenhoso na base e herbáceo na parte superior, podendo atingir até 1,5 m de altura. Os caules são radicantes, prostrados e não articulados. As folhas são opostas, lanceoladas a obovadas, inteiras, carnudas e com pecíolo claro (Martins, 2011).

Esta espécie pode possuir flores femininas e masculinas no mesmo indivíduo, mas não possui flores hermafroditas e dispõem-se em espigas laxas, que no seu conjunto formam um tipo de inflorescência paniculiforme. O período de floração é entre Agosto e Novembro (Martins, 2011).

A biomassa da *H. portulacoides* aumenta no final da Primavera ao início do Verão, diminuindo gradualmente até ao final do Inverno. Os maiores valores de biomassa abaixo do solo são observados em dois períodos: Julho e Setembro, Janeiro e Março (Caçador *et al.*, 2000).

Relativamente à sua distribuição, encontra-se dispersa pela costa da Península Ibérica, nomeadamente no Algarve, Beira Litoral e Estremadura, podendo ainda ser encontrada nas costas do Mediterrâneo, do Atlântico europeu e norte-americano e da África Austral (Silva, 2000 *in* Martins, 2011).

A forma como esta planta interage com o sedimento, nomeadamente na mobilização de diferentes poluentes do solo, levou a que fosse considerada como potencialmente útil, não só para fitoestabilização, como também para fitoextração de solos contaminados (Martins, 2011).

A Figura 2.2 ilustra a *H. portulacoides* no mês de Outubro, no sapal do rio Coina, estuário do Tejo.



Figura 2.2 - Exemplos de *Halimione portulacoides* em ambiente natural no mês de Outubro no sapal do rio Coina, estuário do Tejo.

2.2.2. *Spartina maritima*

Desenvolvendo-se em zonas frequentemente alagadas a *S. maritima* é uma planta cujo tamanho oscila normalmente entre 20-70 cm. As folhas, em geral, são finas e compridas com cerca de 10-40 cm e 0,5-1 cm de espessura na base e confluindo num ponto, tendendo a apresentar uma coloração na gama dos verdes na Primavera e no Verão, e nos castanhos-claros no Outono (Teixeira, 2006).

Produz sementes e flores de cor esverdeada, tornando-se castanhas no Inverno, a época de floração ocorre entre Junho a Setembro. As flores incluem-se no grupo das hermafroditas, sendo que apresentam uma fluorecência de 5-15 cm cilíndrica e geralmente formada por duas a quatro espigas de 4-10 cm. A reprodução efetua-se essencialmente por sementes ou fragmentação dos rizomas. Os rizomas tendem a crescer centrifugalmente formando áreas redondas que servem como armadilhas de sedimentos, tornando-se côncava devido à acumulação de sedimentos na direção da sua zona central (Teixeira, 2006).

A *S. maritima* é uma espécie nativa das costas ocidentais e do Sul da Europa (assim como do Oeste de África), desde os Países Baixos até à costa atlântica de Marrocos, passando por Inglaterra e Irlanda, e encontrando-se, também, nas margens mediterrânicas. Existe também uma população disjunta nas costas atlânticas da Namíbia e da África do Sul (Teixeira, 2006). A Figura 2.3 ilustra a *S. maritima* no mês de Outubro, no sapal do rio Coina, estuário do Tejo.



Figura 2.3 - Exemplos de *Spartina maritima* em ambiente natural no mês de Outubro no sapal do rio Coina, estuário do Tejo.

2.3 Análise SWOT (*strenghts, weaknesses, opportunities, threats*)

Todas as técnicas de descontaminação possuem as suas vantagens e limitações. No presente capítulo realizou-se uma análise SWOT (*strenghts, weaknesses, opportunities, threats*) em que consistiu, a partir da literatura (Reichenauer and Germida, 2008; Pilon-Smits, 2005; McCutcheon and Schnoor, 2003; Susarla *et al.*, 2002) em destacar algumas das vantagens e limitações, assim como, aspetos externos positivos que podem potenciar as vantagens e aspetos negativos que podem pôr em risco as vantagens competitivas da fitorremediação.

As maiores vantagens da fitorremediação passam pelo baixo custo de implementação e manutenção, baixo impacte ambiental, ao contrário de outras tecnologias de descontaminação atuais, que tendem a ser dispendiosas e invasivas (Cunningham and Ow, 1996; Pilon-Smits, 2005). Outra vantagem importante é imprimir ao local da remediação o

aspecto de uma área de paisagem, tendo por isso uma elevada aceitação pública (Pilon-Smits, 2005; Susarla *et al.*, 2002; Alkorta and Garbisu, 2001).

Para além da descontaminação do local, as plantas fornecem uma série de benefícios ao solo, tais como, incorporação de matéria orgânica quando não há necessidade de retirar a planta da área, aumento da infiltração de água no solo, diminuição da erosão do solo, melhoria da estrutura e reciclagem de nutrientes, o que, conseqüentemente, eleva o nível de fertilidade do solo. No caso dos metais, se for necessário retirar a planta do local, a biomassa produzida no processo de fitorremediação pode ser valorizada economicamente sob forma de bioenergia (Gomes, 2012) e para os outros fins, tais como, a confeção de móveis e produção de fibras (Rosa, 2006).

O tempo poderá ser um fator limitante, uma vez que os resultados estão dependentes do ciclo da planta, da concentração do poluente no solo e da presença de outras toxinas que devem estar dentro dos limites tolerados pela planta (Reichenauer and Germida, 2008). Desta forma, o tempo despendido na remediação poderá ser superior em comparação com outras técnicas.

Outro fator que deve ser considerado, é o risco das plantas mobilizarem ou disponibilizarem o contaminante no ambiente, seja por volatilização ou através da cadeia alimentar.

Ao envolver o uso de seres vivos, cuja sobrevivência e desenvolvimento é dependente das características ambientais que variam com os diferentes locais, a fitorremediação implica um maior número de variáveis a serem consideradas, em comparação com os tratamentos físico-químicos convencionais.

Nas últimas décadas, o conhecimento cada vez mais preciso das funções biológicas básicas trouxe avanços biotecnológicos. Aliado ao crescente conhecimento dos fatores que mais influenciam nos processos de fitorremediação, pode fornecer uma base para a modificação genética das plantas, de modo a obter-se um melhor desempenho no processo de remediação (Abhilash *et al.*, 2009). Vários aspetos que condicionam os processos de fitorremediação, incluindo a estrutura da raiz da planta, podem ser melhorados de modo a aumentar o potencial de remoção de contaminantes.

A possibilidade de produzir transgénicos abriu novos campos a testar e novas perspectivas para o desenvolvimento científico e tecnológico, que vão além dos limites da evolução natural (Barceló and Poschenrieder, 2003; Cunningham and Ow, 1996). Normalmente, as plantas transgénicas são originadas a partir da introdução de genes de outros organismos, tais como, bactérias ou mamíferos. Sendo heterotróficos, as bactérias e os mamíferos possuem a maquinaria enzimática necessária para alcançar uma completa mineralização de moléculas

orgânicas, podendo assim, ser utilizada para complementar as capacidades metabólicas das plantas (Eapen *et al.*, 2007).

Na Tabela 2.1 é apresentada uma análise SWOT da técnica em análise.

Tabela 2.1 - Análise SWOT

Forças (Strengths)	Fraquezas (Weaknesses)
<ul style="list-style-type: none"> - Tratamento <i>in situ</i>; - As plantas são organismos autotróficos que utilizam a luz solar e o CO₂ como fonte de carbono e energia; - Conservação dos recursos naturais; - O investimento em capital e o custo da operação são baixos; - Implementação com poucos ou nenhuns distúrbios ambientais; - Cria benefícios ambientais, como o controlo da erosão do solo, sequestro de carbono e habitat; - Em alguns casos, representa uma solução permanente, pois os poluentes orgânicos podem ser mineralizados; - Aplica-se a áreas extensas, onde outras tecnologias não são viáveis; - Tem versatilidade para tratar uma grande variedade de materiais perigosos; - Possibilidade de posterior reutilização do solo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Influenciada pelas condições meteorológicas e pelo clima; - Características do solo e dos contaminantes influenciam o potencial da técnica; - O tempo para se obter resultados satisfatórios pode ser longo; - Remoção está limitada pelo alcance das raízes e biodisponibilidade dos poluentes.
Oportunidades (Opportunities)	Ameaças (Threats)
<ul style="list-style-type: none"> - Elevada aceitação pública: <i>green clean</i>; - Pode ser combinada com outros métodos; - Esteticamente atrativa; - Plantas transgênicas para melhorar o potencial da técnica; - A biomassa produzida pode ser economicamente valorizada em matéria-prima para diversas atividades. 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevadas concentrações de contaminantes podem ser tóxicas para as plantas e animais que possam eventualmente consumi-las; - Contaminantes altamente solúveis em água podem ser mobilizados para as águas subterrâneas (lixiviação); - Possível produção de metabolitos secundários mais tóxicos do que os compostos iniciais.

2.4. Zonas húmidas

Os estuários, designados também por zonas húmidas, são ecossistemas que desempenham papéis ecológicos importantes, tais como, produtividade biológica, regulação do fluxo hidrológico, ciclo biogeoquímico de metais e nutrientes e habitat.

Estes ecossistemas estão entre os mais produtivos do planeta, por causa dos elevados níveis de nutrientes, tanto em sedimentos, como na coluna de água, mas também devido à capacidade de melhorar a qualidade das águas e sedimentos (Reboreda e Caçador, 2007; McLusky & Elliot, 2004).

Tendo em conta razões estratégicas e económicas, os estuários encontram-se muitas vezes situados nas proximidades de áreas densamente povoadas e industrializadas, sendo considerados recetores de poluentes, provenientes tanto das áreas urbanas próximas, como do transporte fluvial e inundação pelas marés. De acordo com trabalhos anteriores (Caçador *et al.*, 2000), o estuário do Tejo recebe descargas das indústrias (p.e. produtos químicos e siderúrgicos) e efluentes de origem antropogénica, acabando por serem incorporados no sedimento (Reboreda and Caçador, 2007b). Neste sentido, estas zonas estão sujeitas a um vasto leque de contaminantes, tendo sido os PPCPs detetados pela primeira vez, em 2004 por Thomas *et al.*

Segundo Caçador *et al.* (2007), a vegetação presente nestas zonas retém as partículas suspensas funcionando como uma armadilha para muitos contaminantes, reduzindo a disponibilidade dos mesmos no ecossistema. Se estes contaminantes estiverem numa forma disponível podem ainda ser absorvidos pelas plantas (Greger, 2004). A absorção é dependente não só da espécie de planta (Burke *et al.*, 2000), mas também das características do sedimento, condições hidrológicas e do tempo de exposição (Almeida *et al.*, 2004).

Neste sentido, a utilização das zonas húmidas como filtro de contaminantes, tem ganho um crescente interesse devido à necessidade de tratamentos alternativos, que possam remover os PPCPs das águas residuais “tratadas” (Carvalho *et al.*, 2013; Caçador *et al.*, 2007; Dordio *et al.*, 2010). Por isso, estes sistemas têm vindo a ser estudados e têm obtidos bons resultados na remediação de uma variedade de contaminantes (Williams, 2002).

Nos sistemas de leitos de macrófitas, existem diferentes condições microambientais, com propriedades físico-químicas que permitem ambas as vias metabólicas (anaeróbia e aeróbia) de degradação. No entanto, ainda existe a necessidade de clarificar os processos de transformação e eliminação que conduzem à supressão de PPCPs, de modo a obter um

tratamento otimizado (Zhang *et al.*, 2013a). A variedade de mecanismos e processos que podem ocorrer nestes sistemas complexos são ilustrados na Figura 2.4.

Até ao momento, poucos estudos foram concluídos sobre os papéis específicos desempenhados por degradação microbiana, fotodegradação e absorção pelas plantas em sistemas à base de plantas aquáticas, usadas para remediar PPCPs, e os dados disponíveis sobre a absorção pelas plantas são limitados a apenas alguns compostos e espécies de plantas (Zhang *et al.*, 2013a).

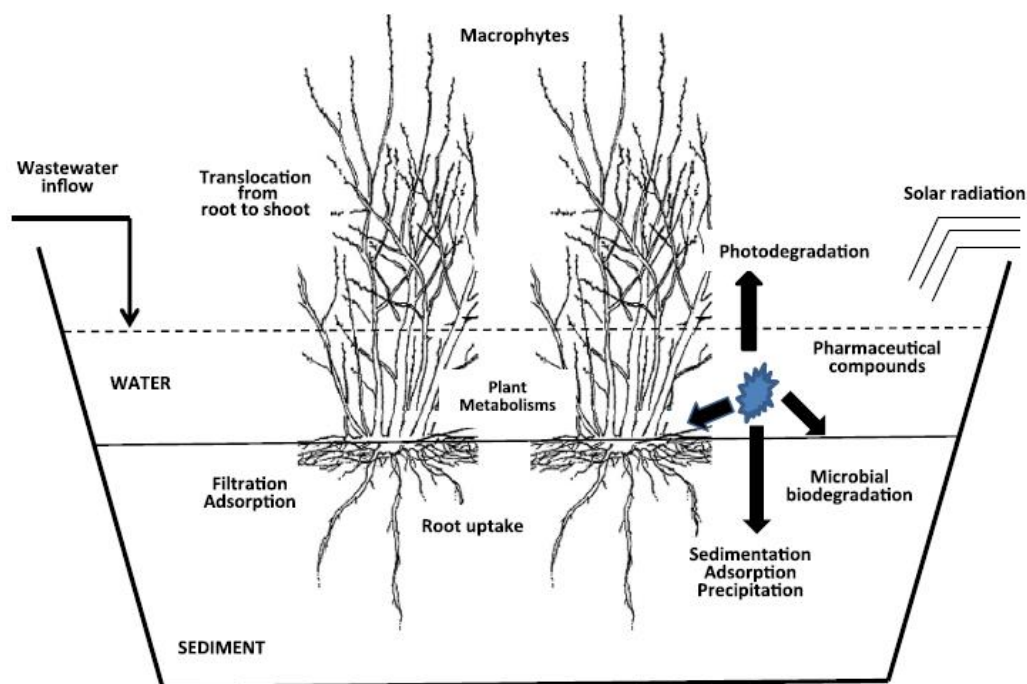


Figura 2.4 - Mecanismos de remoção de fármacos em zonas húmidas (Fonte: Zhang *et al.*, 2013a).

A partir de estudos já realizados, sabe-se que estes sistemas demonstram uma significativa remoção de contaminantes, em comparação com leitos não plantados (Matamoros and Salvadó, 2012; Matamoros *et al.*, 2007). Dordio *et al.* (2010), avaliaram a construção de zonas húmidas com plantas mostrando-se o processo eficiente, tendo removido até 96% dos PPCPs presentes. De forma análoga, Matamoros *et al.* (2012a) observou que a cafeína foi removida mais facilmente (83 e 99%) por sistemas de leitos com macrófitas, do que em sistemas de leitos sem plantas (0 a 30% de remoção). Carvalho *et al.* (2013) estudaram sistemas de leito de macrófitas como passo de polimento direcionado à remoção de PPCPs dos efluentes das ETARs. Os ensaios em microcosmos com a presença da espécie *Phragmites australis*, evidenciaram que a mesma pode desempenhar um papel importante na remoção de PPCPs do meio aquático. Com as vantagens de baixo custo, simples operação, manutenção e respeito pelo ambiente, estes sistemas podem constituir uma alternativa aos sistemas comuns de tratamento de água residuais (Zhang *et al.*, 2013a).

2.5. Produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal

De entre os vários poluentes que diariamente são descarregados para o ambiente, destacam-se os fármacos e os produtos de cuidado pessoal, PPCPs pelas características que apresentam e elevado consumo em todo o mundo (produção anual excede 10^6 t) (Kümmerer, 2004; Daughton and Ternes, 1999).

De um modo geral, estes produtos são consumidos por razões estéticas, ou para prevenir, diagnosticar, mitigar ou curar doenças em seres vivos. Neste sentido, novas substâncias farmacologicamente ativas são desenvolvidas continuamente, com destinos e efeitos desconhecidos no ambiente (Zhang *et al.*, 2013a).

A falta de informação, a não obrigatoriedade da sua monitorização, a ausência de metodologias de controlo e de tecnologias de eliminação e tratamento, são alguns dos fatores que contribuem para que os PPCPs tenham sido considerados poluentes emergentes e tenham merecido uma crescente atenção nos últimos anos (Carvalho *et al.*, 2013).

2.5.1. Características físico-químicas

O destino e efeitos dos PPCPs dependem das suas características estruturais e propriedades físico-químicas (Susarla *et al.*, 2002).

Coefficiente de partição octanol-água

Um dos parâmetros mais significativos para prever as concentrações de compostos orgânicos nos tecidos das plantas e o potencial para eliminação dos mesmos, designa-se por coeficiente de partição octanol-água ($\text{Log } K_{ow}$). Este parâmetro consiste na razão entre a concentração de composto não ionizado entre octanol e água, e tem sido adotado como a medida padrão de hidrofobicidade de um composto químico (Reinhold *et al.*, 2010).

Nas membranas celulares das plantas, não existem transportadores específicos de compostos orgânicos sintéticos, tais como, os PPCPs. Assim, a absorção destes compostos na planta é acionada por difusão, que é largamente dependente das propriedades químicas dos compostos, especialmente da sua hidrofobicidade (Stottmeister *et al.*, 2003).

Compostos extremamente hidrofóbicos ($\text{Log } K_{ow} > 3$), são fortemente ligados à matéria orgânica do solo e não se dissolvem na água intersticial. Esta falta de biodisponibilidade pode

limitar a fitorremediação, porque os compostos tornam-se recalcitrantes à biodegradação, resultando numa acumulação nessas zonas (Pilon-Smits, 2005).

Estudos anteriores indicam que a absorção direta de fármacos pelas plantas, é um mecanismo de remoção eficaz para os compostos com valores de $\text{Log } K_{ow}$ entre 0,5 e 3 (Dietz and Schnoor, 2001; Pilon-Smits, 2005; Schnoor *et al.*, 1995). Tais compostos são lipofílicos o suficiente para se moverem através da bicamada lipídica das membranas e ainda solúveis em água para se moverem para os fluidos celulares (Zhang *et al.*, 2013a).

Shenker *et al.* (2011) estudaram a absorção da carbamazepina ($\text{Log } K_{ow} = 2,45$) pelas plantas de pepino irrigadas com águas residuais tratadas. Os dados obtidos a partir das experiências sugerem que a carbamazepina foi absorvida, translocada e acumulada principalmente nas folhas (76-84% de absorção total). Apesar do fator de bioacumulação no pepino (0,8 - 1) ter sido significativamente mais baixo do que o valor calculado nas folhas (17 - 20), os autores destacam os potenciais riscos associados a esta prática agrícola porque, neste caso, a parte comestível da planta é o fruto. No entanto, para o tipo de culturas em que a parte comestível são as folhas (p.e. alfaces e couves), pode implicar a necessidade de uma maior preocupação especialmente em áreas que utilizam como fonte de irrigação efluentes mesmo que tratados.

Substâncias muito hidrofílicas ($\text{Log } K_{ow} < 0,5$) podem ser transportadas para o interior da planta, mas não são capazes de atravessar a bicamada lipídica (Reichenauer and Germida, 2008).

Contudo, as características hidrofóbicas dos compostos, não são suficientes para avaliar o comportamento de adsorção, absorção e distribuição no meio. Em geral, estes mecanismos dependem de muitos fatores, incluindo propriedades dos compostos (p.e. estrutura química, solubilidade em água, pKa) e características do solo (p.e. composição em matéria orgânica, potencial redox, temperatura, pH, força iónica, catiões, aniões) (Kümmerer, 2004).

Coefficiente de distribuição octanol-água

O coeficiente de distribuição octanol-água ($\text{Log } D_{ow}$) representa a hidrofobicidade de compostos orgânicos iónicos em função do pH. Este coeficiente tem sido sugerido como um indicador para a eficiência de remoção de PPCPs nos processos de tratamento biológico (Lee *et al.*, 2011). Lee *et al.* (2011) encontraram uma relação inversa entre o valor de $\text{Log } D_{ow}$ e as eficiências de remoção de diversos PPCPs em tratamentos à base de plantas aquáticas. No

entanto, segundo Zhang *et al.* (2013a), esta relação não pode ser tomada como regra. Isto porque embora a maioria dos compostos com $\text{Log } D_{ow} < 0$ apresentem geralmente, taxas de remoção eficientes ($> 80\%$), a remoção do ácido clofíbrico ($\text{Log } D_{ow} < 0$) mostrou ser baixa.

Coeficiente de partição do carbono orgânico

O coeficiente de partição do carbono orgânico (K_{oc}) é definido como a razão da massa de contaminantes adsorvidos por unidade de peso de carbono orgânico no solo, com a concentração em solução. Os valores de K_{oc} dão a indicação da mobilidade dos compostos orgânicos no solo. Valores baixos de $\text{Log } K_{oc}$ estão relacionados com compostos móveis (Grathwohl, 1990 *in* Zhang *et al.*, 2013a).

Constante de Henry

Outra propriedade química dos compostos que afeta o movimento nos solos é a volatilidade. A volatilidade é expressa pela constante de *Henry* que deriva a partir da pressão de vapor dos compostos. Compostos com $H > 10^{-4}$ tendem a mover-se pelos poros no solo, ao contrário dos compostos com $H < 10^{-6}$ que se movem predominantemente na água. Se $10^{-4} < H < 10^{-6}$ os compostos são móveis tanto no ar como na água. Esta constante deriva da pressão de vapor (Pa) e da solubilidade em água (mg L^{-1}).

2.5.1.1. Características dos PPCPs em análise

Os PPCPs utilizados no presente estudo foram: cafeína, oxibenzona e triclosan.

Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina, CAF) é um estimulante do sistema nervoso central, sendo um dos PPCPs mais consumidos no mundo (Zhang *et al.*, 2013b). É um composto que pode ser encontrado em bebidas como café, chá, chocolate, refrigerantes, algumas bebidas alcoólicas, alimentos e ainda em medicamentos, como analgésicos.

Devido à sua elevada solubilidade ($21,7 \text{ g L}^{-1}$), é suscetível de ser persistente no ambiente, tendo sido constantemente detetada em águas residuais tratadas (Ternes *et al.*, 2001), águas superficiais (Buerge *et al.*, 2003) e águas subterrâneas (Burkhardt *et al.*, 1999 *in* Zhang *et al.*,

2013b) na ordem dos $\mu\text{g L}^{-1}$. A presença de CAF em águas superficiais ou subterrâneas é prova inquestionável da mistura com efluentes contaminados, pois a cafeína não é consumida por animais e nem está presente em fertilizantes. Com efeito, Buerge *et al.* (2003), demonstraram que este composto é um marcador antropogénico adequado de contaminação por águas residuais domésticas nas águas superficiais (Zhang *et al.*, 2013b).

Oxibenzona

A oxibenzona (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, benzofenona-3, HMB) consiste num composto que adquire um elevado fator de proteção solar contra a radiação ultravioleta do tipo UV-B e UV-A, em produtos tais como, cremes e protetores solares (Magi *et al.*, 2012). Há muito debate sobre se a HMB representa uma ameaça para a população como um disruptor endócrino. Sendo que muitos países já regulam a sua utilização (Wang *et al.*, 2013).

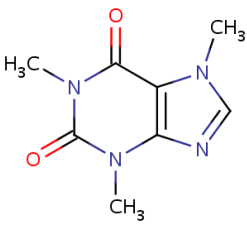
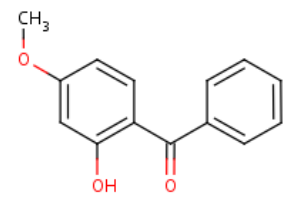
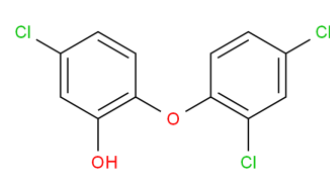
Triclosan

O triclosan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)-fenol, TCS) é um agente bacteriostático bifenólico com uma ampla variedade de atividade sobre bactérias e fungos, através da inibição do seu crescimento (Ying *et al.*, 2007). A maior parte da sua utilização está associada ao uso doméstico e a produtos de higiene pessoal (p.e. dentífricos, elixires, sabonetes e desodorizantes). A concentração usual do TCS na ampla gama de produtos que o contém, é de 0,1% a 0,2%, e em sabonetes antissépticos é de 1% (Aufiero *et al.*, 2012).

Os usos deste composto, aliados às suas características físico-químicas, podem fazer com que seja libertado para o sistema de águas residuais, onde existe potencial para a libertação no ambiente aquático (WFD-UKTAG, 2009).

Na Tabela 2.2. estão compiladas algumas propriedades físico-químicas dos compostos em estudo.

Tabela 2.2 - Propriedades físico-químicas da cafeína, oxibenzona e triclosan

Nome comum	Cafeína	Oxibenzona	Triclosan
Nome IUPAC	1,3,7-trimetilxantina	2-hidroxi-4-metoxibenzofenona	5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxy)-fenol
Categoria	Estimulante	Agente de proteção solar	Antisséptico
Estrutura			
Fórmula Molecular	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂
MM^a (g mol ⁻¹)	194,19	228,24	289,55
S_A^b (mg L ⁻¹ a 25°C)	2.16*10 ⁴	69	10
pK_a^b (a 25 °C)	10,4	7,6	7,9
Log K_{ow}^{a, d, b}	-0,07	3,8	4,76
Log D_{ow}^d	-0,55	3,7	4,31
Log K_{oc}^{b, c}	1	2,7	3,96
H^{b, c} (Pa m ³ mol ⁻¹ a 25°C)	3,58*10 ⁻¹¹	1,50*10 ⁻⁸	2,4x10 ⁻⁷
Ponto de ebulição^a (°C)	178	150 - 160	280 - 290
Ponto de fusão^a (°C)	234 – 236,5	62 - 64	56,4

^aSigma-Aldrich, 2014; ^bPubchem, 2014; ^cWFD-UKTAG, 2009; ^dZhang et al., 2013a.

2.5.2. Presença de PPCPs no ambiente

De modo a servirem um propósito terapêutico, os PPCPs são desenvolvidos para serem, na sua maioria, persistentes, mantendo as suas propriedades químicas. Isto faz com que 50% a 90% da dosagem seja excretada inalterada, o que torna difícil a sua degradação (Bila and Dezotti, 2003). Neste sentido, os PPCPs de utilização humana ocorrem, principalmente, a

partir do ponto de origem de descarga, ou seja, nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs), onde não são completamente removidos (Daughton and Ternes, 1999; Matamoras *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013). Na Figura 2.5 encontram-se as concentrações (ng L^{-1}) de trinta e nove PPCPs detetados num afluente de ETAR em Xiamen, China.

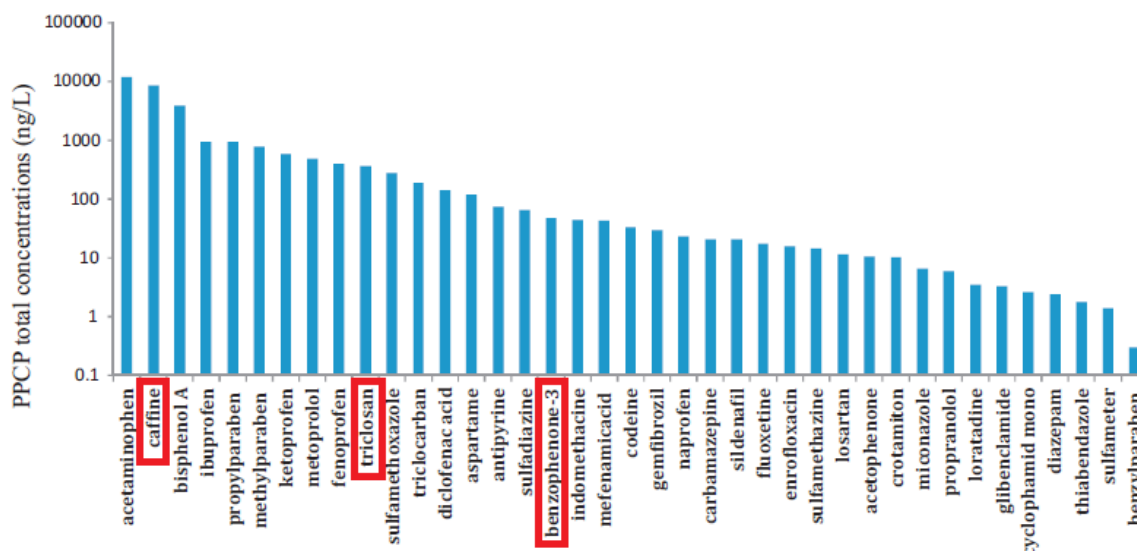


Figura 2.5 - Concentrações totais de PPCPs medidas num afluente (Fonte: Sun *et al.*, 2013).

As ETARs apresentam tecnologias convencionais de tratamento, cujo principal objetivo consiste em remover compostos que apresentem facilidade ou moderada facilidade, em serem biodegradados. Estas estações de tratamento não estão especificamente projetadas para receberem efluentes que contêm uma grande quantidade de vestígios de diferentes poluentes (Verlicchi *et al.*, 2012; Dordio *et al.*, 2010; Heberer, 2002), cujas propriedades químicas e físicas, nomeadamente solubilidade, volatilidade, adsorção, absorção, biodegradabilidade, polaridade e estabilidade, variam muito (Ziylanand Ince, 2011; Le Minh *et al.*, 2010). Desta forma, as características únicas dos poluentes têm óbvias repercussões ao longo dos tratamentos e, conseqüentemente, na eficiência de remoção (ver Figura 2.6).

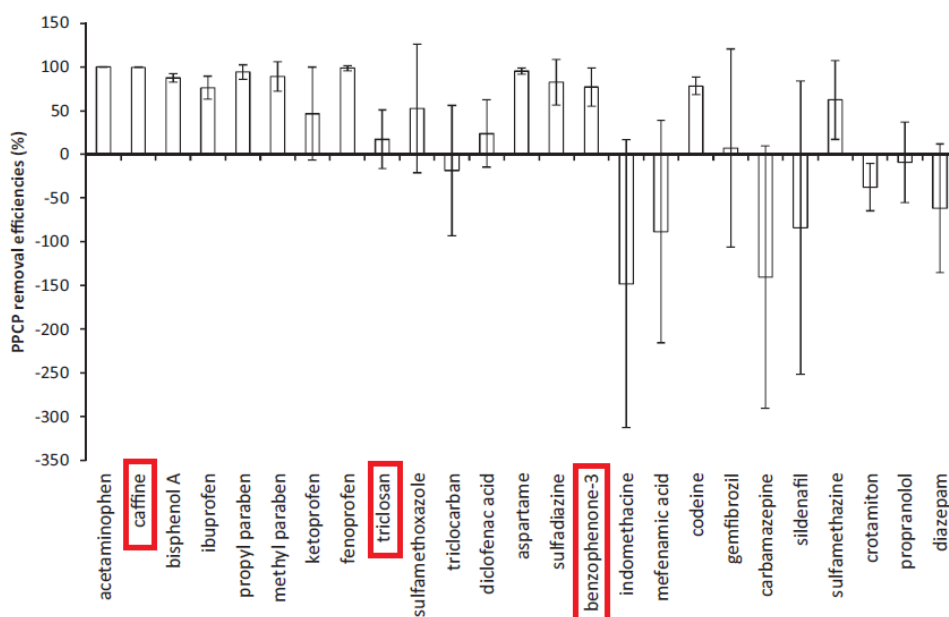


Figura 2.6 - Eficiências médias de remoção de PPCPs (barras de erro representam o desvio padrão) (Fonte: Sun *et al.*, 2013).

Como não existem processos de tratamento especificamente concebidos para a remoção de PPCPs, estes têm sido detetados nos últimos anos, bem como os seus metabolitos, em concentrações na faixa dos nanogramas por litro (ng L^{-1}) a microgramas por litro ($\mu\text{g L}^{-1}$), nas águas residuais, águas superficiais, águas subterrâneas e na água para consumo humano (Bila and Dezotti, 2003; Dordio *et al.*, 2010; Heberer, 2002; Verlicchi *et al.*, 2012). Para além das águas, estes compostos carecem de especial atenção, porque a grande maioria tem uma elevada capacidade de adsorção ao solo e sedimento (Díaz-Cruz *et al.*, 2003), tal como o TCS que graças à sua natureza hidrofóbica foi detetado no sedimento com uma concentração entre $0,09 - 51 \text{ mg kg}^{-1}$ (Zhao *et al.*, 2010).

Vários estudos têm relatado a frequência e a concentração de diversos PPCPs no meio aquático, estando a CAF e o TCS entre os compostos mais frequentemente detetados (Fent *et al.*, 2006). Um estudo realizado por Blair *et al.* (2013) mostrou a presença de cinquenta e quatro PPCPs em águas superficiais e sedimentos até 3,2 km de uma ETAR. No total, trinta e dois PPCPs foram detetados no Lago Michigan, trinta detetados nas amostras de sedimento, e ainda inúmeros PPCPs detetados acima de 3,2 km de distância da costa. A CAF e o TCS foram dois dos quatro PPCPs com frequência superior a 50% em todos os locais de amostragem no Lago Michigan: CAF (97,6%) e TCS (71,4%). De forma semelhante, Kolpin *et al.* (2002) realizaram um estudo de compilação da ocorrência de PPCPs e outros contaminantes orgânicos em águas residuais e recursos hídricos. A CAF foi detetada com a frequência de 70% e o TCS de 60%.

Na Tabela 2.3 apresentam-se alguns dos valores referidos pela literatura detetados no meio aquático.

Tabela 2.3 - Concentrações de cafeína, TCS e HMB nas águas

Compostos	Matriz	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Fonte
CAF	Afluentes	7 – 73	Buergue <i>et al.</i> , 2003
	Efluentes	0,15 - 11,4	Aga, 2008
		6,0	Kolpin <i>et al.</i> , 2002
		0,03 - 9,5	Buergue <i>et al.</i> , 2003
	Águas superficiais	0,11 - 1,39 0,01 - 0,25	Blair <i>et al.</i> , 2013 Buergue <i>et al.</i> , 2003
	Águas subterrâneas	0,23	Seller <i>et al.</i> , 1999
HMB	Efluentes	0,081 - 0,61 3×10^{-5} - $3,6 \times 10^{-4}$	Aga, 2008 Loraine and Pettigrove, 2006
	Águas superficiais	0,11	Aga, 2008
TCS	Afluentes	0,38 – 3,36	Aga, 2008
	Enfluentes	0,106 - 0,321	Aga, 2008
		0,02 - 0,43	Ying <i>et al.</i> , 2007
		1 - 10	Lindström <i>et al.</i> , 2002
	Águas superficiais	0,07 0,01 - 0,06 $1,4 \times 10^{-3}$ - 0,07	Kolpin <i>et al.</i> , 2002 Blair <i>et al.</i> , 2013; Aufiero, 2012 Lindström <i>et al.</i> , 2002
	Águas subterrâneas	$< 4 \times 10^{-4}$	Lindström <i>et al.</i> , 2002

2.5.2.1. Efeitos no ambiente

Os efeitos ecotoxicológicos dos PPCPs ainda estão pouco estudados (Richardson *et al.*, 2005). No entanto, os estudos já realizados, demonstram que a ocorrência destes compostos, mesmo em concentrações residuais no meio aquático, necessita de ser estudada de modo a determinar os efeitos tóxicos perante o ambiente (Bila and Dezotti, 2003).

Daughton e Ternes (1999) identificam as principais ameaças de PPCPs como efeitos subtis, contínuos, mas indetetáveis ou que vão passando despercebidos, e que se vão acumulando lentamente até haver mudanças que se vão notar, e que podem ser irreversíveis. Devido aos possíveis efeitos de bioacumulação a longo prazo, o efeito pode ser em qualquer nível da hierarquia biológica: célula – órgãos - organismo - população – ecossistema (Pietogrande, 2007; Bila and Dezotti, 2003).

Alguns dos impactos ecotoxicológicos já identificados em organismos no ambiente aquático e terrestre, podem incluir o desenvolvimento da resistência aos antibióticos e diminuir a diversidade de plâncton (Fent *et al.*, 2010; Reinhold *et al.*, 2010).

Segundo Aufiero *et al.* (2012), o TCS pode representar um risco para os organismos aquáticos, quando entra no ecossistema através dos efluentes, principalmente para as algas. Isto porque o TCS é altamente tóxico para as bactérias que são necessárias para as algas realizarem o processo de fotossíntese (Tatarazako *et al.*, 2004). Tal facto é preocupante no sentido em que as algas são consideradas produtores primários, ou seja, as consequências da presença do TCS nas algas vão afetar o resto do ecossistema.

A ocorrência generalizada de filtros UV (p.e. oxibenzona) em sistemas aquáticos tem sido relatada, mas ainda pouco se sabe sobre os seus efeitos ambientais. Sabe-se que alguns destes compostos podem interagir negativamente com o sistema hormonal dos organismos, resultando numa diminuição da fecundidade e capacidade reprodutiva (Fent *et al.*, 2010; Pietogrande, 2007).

2.5.2.2. Destino de PPCPs no ambiente

Uma vez no ambiente, o destino dos PPCPs não é linear podendo seguir muitos caminhos. Embora a remoção geralmente inficiente nas ETARs seja uma das principais formas de contaminação do ambiente por PPCPs, dada a variedade de aplicações, são inúmeras as vias através das quais estes compostos e respetivos metabolitos entram nos diferentes ecossistemas (Bila and Dezotti, 2003).

A Figura 2.7 ilustra possíveis rotas que um fármaco pode seguir no ambiente, depois da sua produção e posterior consumo pelos seres vivos.

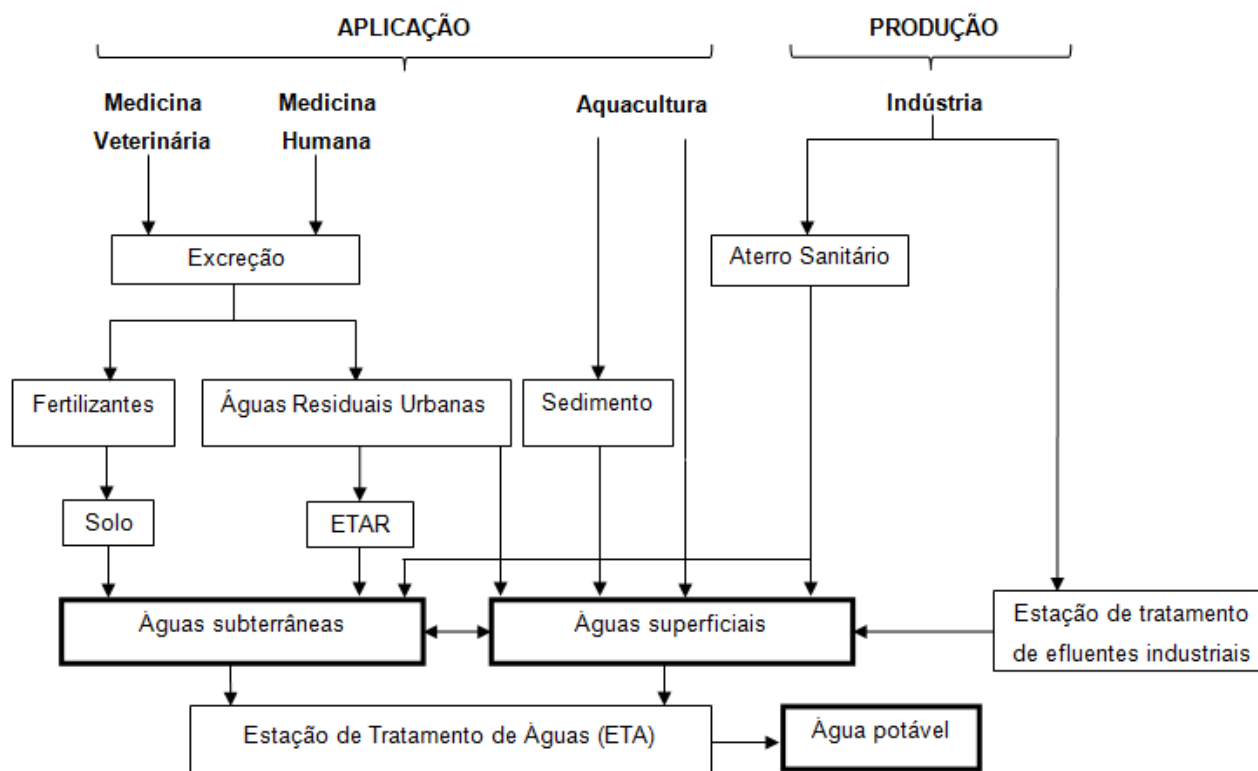


Figura 2.7 - Possíveis rotas de fármacos e seus metabolitos no ambiente (Adaptado de Bila and Dezotti, 2003).

Os PPCPs acabam por surgir nas águas através da excreção dos mesmos, uma vez que são encontrados vestígios destes compostos metabolizados de forma incompleta. Estes compostos podem passar pelos sistemas de tratamento de águas convencionais, sendo detetados em rios, lagos e até mesmo nos aquíferos. Por outro lado, também há PPCPs não consumidos que acabam por ser colocados diretamente no lixo, terminando em aterros sanitários, podendo vir a contaminar por lixiviação as águas subterrâneas. Uma outra rota de contaminação das águas subterrâneas advém da utilização de estrume animal como fertilizante. Os fármacos, particularmente os antibióticos, são usados como promotores de crescimento na produção de gado, na produção avícola e são intensivamente usados como aditivos de alimento de peixes na aquicultura. Sendo assim, podem contaminar o solo, águas subterrâneas e superficiais (Bila and Dezotti, 2003).

2.6. Determinação de PPCPs

2.6.1. Métodos de extração

2.6.1.1. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (sigla em inglês: SPE - *Solid Phase Extraction*) é uma das ferramentas mais utilizada para a extração, concentração e purificação de analitos presentes em matrizes líquidas, que exibem uma vasta gama de polaridades e propriedades físico-químicas, e que, muitas vezes, estão em quantidade vestigial, como é o caso dos PPCPs (Pietrogrande, 2007; Queiroz, 2001; Fifield, 2000).

É uma técnica de separação líquido-sólido que envolve a separação dos componentes das amostras em solução, através da sua interação seletiva e retenção por uma fase estacionária sólida, denominada adsorvente (Hennion, 1999).

Relativamente ao adsorvente, existe uma grande variedade que pode ser utilizada, desde fases de sílica modificadas de C8 a C18 (fases reversas), resinas poliméricas, alumina, ciano e florisil, cuja seleção depende da natureza dos analitos a analisar e às quais correspondem diferentes tipos de interação analito-fase estacionária. Estas interações podem ocorrer entre forças atrativas apolares, denominadas por forças Van-Der Waals ou forças de dispersão. É de realçar que a extração depende das diferenças entre as afinidades dos vários componentes da amostra para com o adsorvente e, por isso, o material de enchimento deverá ser selecionado por forma a aumentar a eficiência do processo (Somenath, 2003; Fifield, 2000; Sigma-Aldrich Co., 1998). Na Figura 2.8 apresenta-se um cartucho utilizado em SPE.



Figura 2.8 – Cartucho HLB® 6cc (200 mg) da Waters (Saint-Quentin En Yvelines Cedex, France) para SPE.

Consoante os analitos que se pretendem analisar, recorre-se a diferentes enchimentos, tendo em atenção as seguintes características (Pereira, 2006 *in* Abreu, 2008):

- Ser poroso e com elevada área superficial;
- Garantir uma adsorção reversível do analito;
- Apresentar uma baixa percentagem de impurezas;
- Manifestar estabilidade química e térmica;
- Assegurar uma boa superfície de contacto entre a fase sólida e o analito;
- Promover taxas de recuperação elevadas.

Em geral, os procedimentos de SPE consistem em quatro etapas: 1) condicionamento do adsorvente, 2) passagem da amostra, 3) lavagem e 4) eluição.

O condicionamento consiste na adição de um solvente, de modo, a remover possíveis impurezas do cartucho de SPE e/ou do solvente e assegurar que a matriz se vai infiltrar adequadamente na fase sólida. Esta fase faz com que o pH do solvente seja compatível com o da solução da matriz, evitando-se assim, alterações químicas indesejáveis quando a matriz é adicionada. Além disso, esta fase melhora a reprodutibilidade de um método analítico (Fifield, 2000).

A percolação consiste na passagem lenta da amostra em fase líquida, sob pressão ou sucção, pelo cartucho. O composto de interesse irá distribuir-se entre a amostra no estado líquido e a fase sólida, atingindo-se assim um equilíbrio. Inicialmente, como resultado das interações fortes que se estabelecem, o analito é retido pela fase sólida e, desta forma, isolado na matriz (retenção). O tamanho da amostra deve ser selecionado de modo a estar dentro da capacidade do leito adsorvente, e a taxa de fluxo do solvente não deve ser excessiva, de outra forma, a eficiência de retenção será prejudicada e processo de separação será incompleto (Fifield, 2000).

Em seguida, poderá incluir-se um passo de lavagem da coluna de extração (fase estacionária), com um solvente orgânico para remover os interferentes, ou um passo de secagem da coluna. Se este passo for excluído do processo, os compostos interferentes são retidos, e apenas as moléculas do analito são removidas do adsorvente. A escolha do solvente com que se efetua a lavagem, o pH e a força iónica das soluções aquosas, em especial a sua polaridade, também são determinantes no controlo da seletividade e eficiência de uma extração (Fifield, 2000).

A remoção do analito é efetuada por meio de eluição, utilizando um solvente apropriado (eluente), ao qual o analito tem mais afinidade química, e que o arrastará. O extrato obtido de

volume reduzido pode ser diretamente analisado por cromatografia, ou em alternativa ser evaporado e reconstituído com um solvente mais adequado da análise pretendida. Na Figura 2.9 é possível observar o esquema ilustrativo do processo.

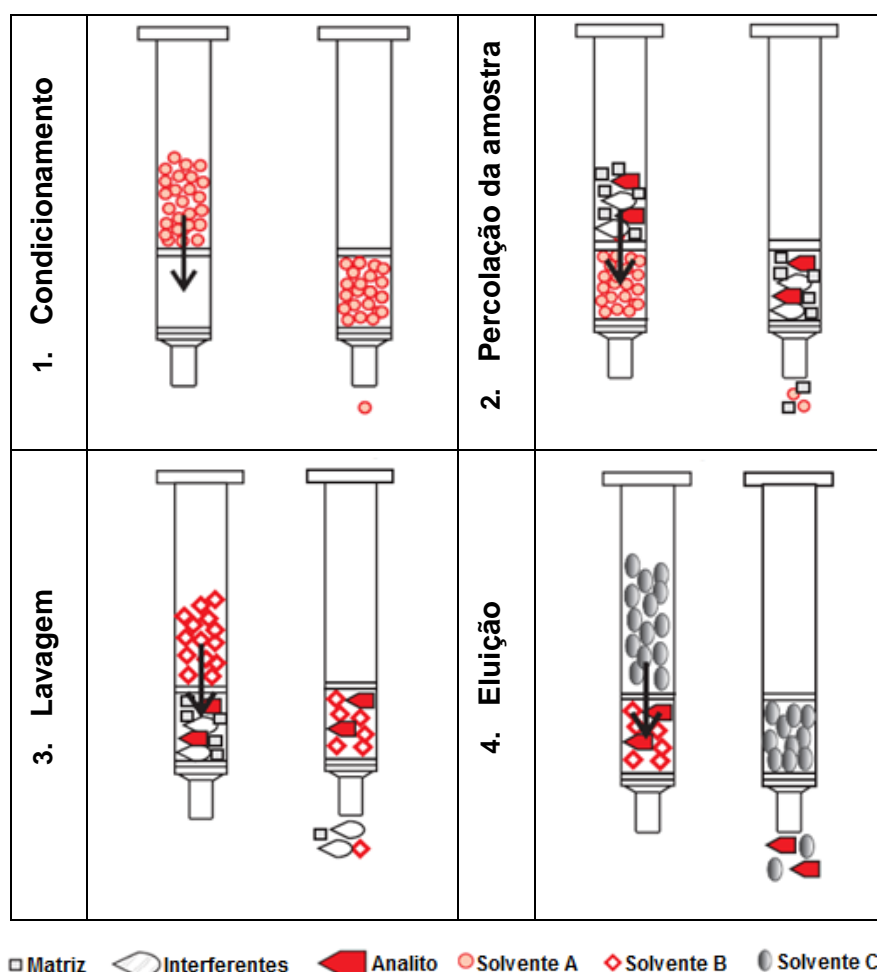


Figura 2.9 - Etapas envolvidas no processo de SPE (Adaptado de Sigma-Aldrich Co., 1998).

Esta técnica apresenta diversas vantagens, uma vez que possui rapidez e facilidade de manuseamento, combinando extração com limpeza e concentração de amostras, removendo os componentes interferentes da matriz. Isto com um consumo reduzido de solventes orgânicos, permitindo também a troca de solventes (p.e. aquoso para orgânico), e utilização de menores volumes de amostra (Hennion, 1999).

Apesar da SPE apresentar vantagens em relação aos métodos mais clássicos de extração, esta técnica também apresenta algumas limitações. Uma delas refere-se à etapa de dessorção do analito aprisionado no cartucho de SPE que requer, geralmente, o uso de solventes tóxicos. Outra limitação consiste na possível remoção incompleta de interferências, o que pode levar a uma elevada variabilidade nos resultados (Fifield, 2000).

2.6.2. Métodos de análise

A metodologia analítica para a determinação de PPCPs traço em matrizes ambientais complexas ainda está em desenvolvimento e o número de métodos descritos na literatura tem crescido consideravelmente (Barceló and Poschenrieder, 2003).

2.6.2.1. Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (sigla em inglês: GC - Gas *Chromatography*) é um dos métodos mais comuns para análise de compostos orgânicos (Wiley, 2003). O conceito chave acoplado a esta técnica, é a volatilização dos compostos quando estes são aquecidos. Assim, esta técnica pode ser usada para compostos mais voláteis ou semi-voláteis (Fifield, 2000).

O processo de volatilização ocorre a uma dada temperatura definida no injetor, sendo os analitos introduzidos na coluna analítica, sob a forma gasosa, com o auxílio de um gás de arraste (hidrogénio, hélio ou azoto). Ao entrar na coluna que está normalmente a uma temperatura inicial muito mais baixa que o injetor, os analitos (e parte do solvente que foi injetado) condensam, sendo retidos pela fase estacionária. O efeito entre o gás de arraste (fase móvel) e o aumento da temperatura do forno promovem a eluição dos analitos, idealmente a diferentes velocidades, de forma a atingir a separação de todos os componentes da mistura injetada. A distinção entre os analitos depende da capacidade de distribuição que estes têm entre a fase estacionária e a fase móvel, havendo portanto um equilíbrio de distribuição entre fases, que é determinante para a separação cromatográfica dos solutos. À saída da coluna os analitos são detetados (pelo detetador) e cuja resposta é proporcional à concentração do analito no gás de arraste (Fifield, 2000).

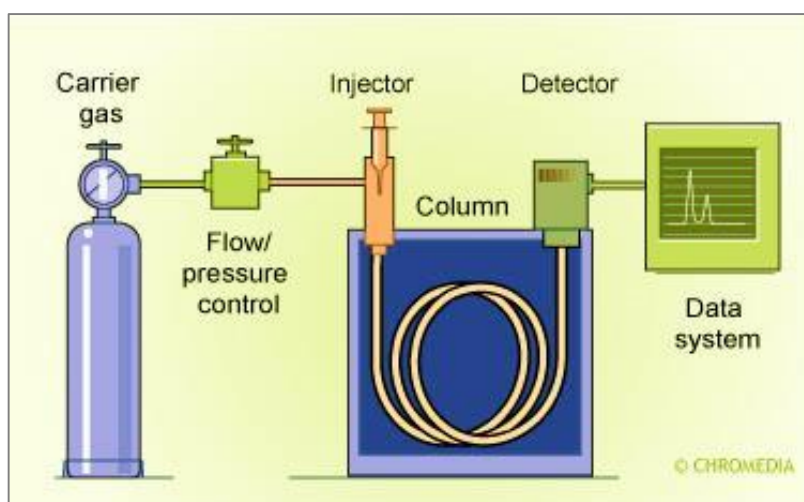


Figura 2.10 - Cromatografia gasosa (Fonte: <http://www.chromedia.org/>).

A detecção em cromatografia gasosa é um parâmetro fundamental como em qualquer outra técnica analítica, porque condiciona diretamente a eficiência e a especificidade da análise. Um detetor ideal para GC deve proporcionar sensibilidade adequada, originando limites de detecção baixos, deve ser estável e reprodutível, originar uma resposta linear numa gama alargada de concentrações.

Na cromatografia gasosa a amostra é introduzida num injetor, por intermédio de uma seringa, ligado à coluna cromatográfica (fase estacionária). A amostra é arrastada pela fase móvel (gás de arraste) ao longo da fase estacionária. Pela aplicação de um programa de rampas de temperatura os diferentes compostos da mistura são separados. Estes compostos saem da coluna dissolvidos no gás de arraste e passam pelo detetor. No caso do detetor por ionização de chama (FID) irão sofrer pirólise à temperatura da chama de ar, pela ação do H_2 , produzindo iões e eletrões que conduzem eletricidade através da chama. Assim, os compostos são separados com base nos seus pontos de ebulição e polaridade (Fifield, 2000).

A cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC/MS), fornece a sensibilidade e a seletividade necessária para identificação e quantificação de analitos em níveis residuais. No espectrómetro de massa, os compostos provenientes da coluna cromatográfica são convertidos em iões, separados em função da sua razão massa/carga (m/z) e conduzidos até ao detetor (Pietogrande and Basaglia, 2007).

Capítulo 3 – Materiais e métodos

3.1. Avaliação de potencial de fitorremediação de plantas estuarinas

3.1.1. Desenho experimental

O presente trabalho consistiu em dois ensaios de fitorremediação com três PPCPs: CAF, HMB e TCS, em diferentes matrizes:

- A. Solução de *Hoagland*;
- B. Elutriado (E) e elutriado com sedimento (ES).

O desenho experimental é apresentado na Figura 3.1.

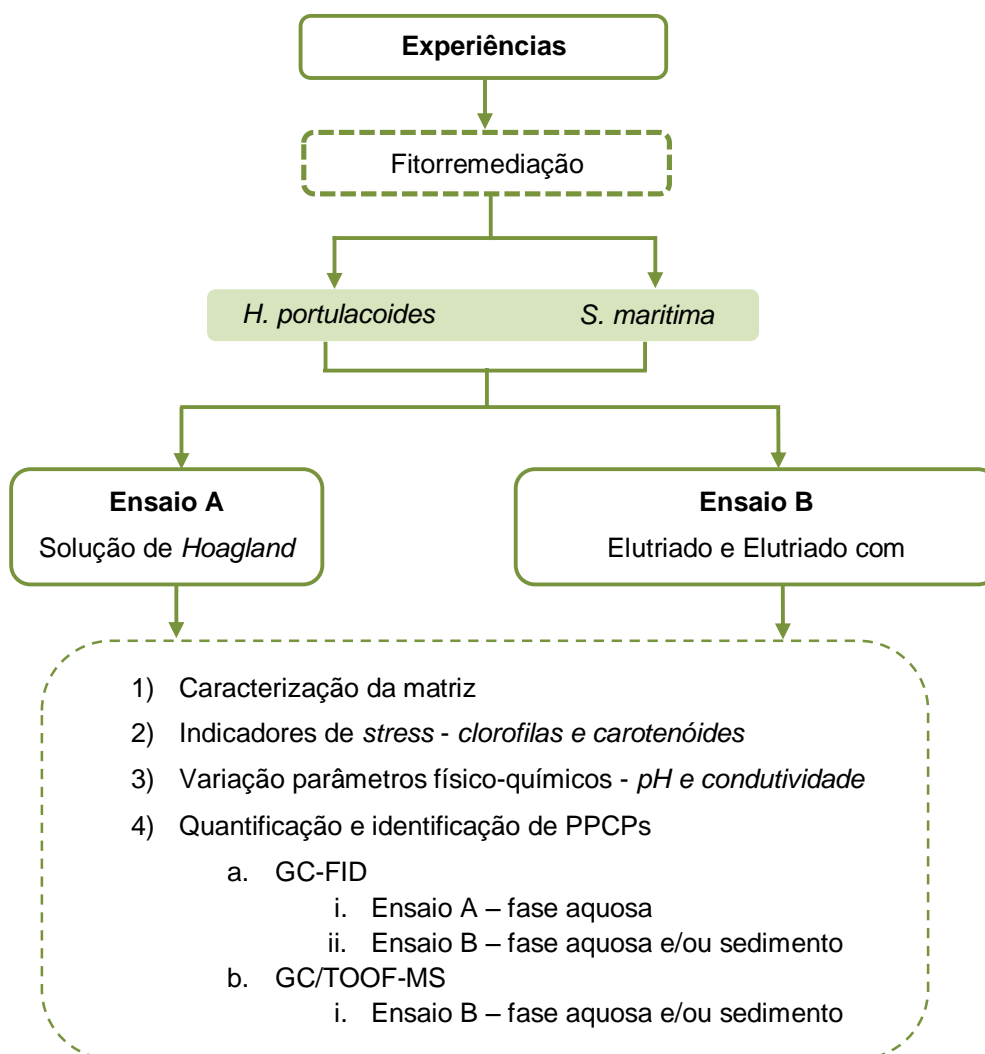


Figura 3.1 - Desenho experimental de ensaios de remoção de PPCPs.

3.1.2. Descrição do local de amostragem

A colheita de plantas, sedimento e água foi realizada no sapal do rio Coina que pertence ao estuário Tejo. O estuário do Tejo, localizado na costa ocidental da Europa, cobre uma área de cerca de 320 km² (Sousa *et al.*, 2008). O rio Coina nasce no Parque Natural da Arrábida, na povoação de Parral e desagua no Rio Tejo. Este sapal (38°36'59.39" N; 9°02'33.41" O) está localizado no concelho do Barreiro, Península de Setúbal, e é uma área rodeada por zonas urbanas e industriais, no entanto, rica em biodiversidade (Sousa *et al.*, 2008). Na Figura 3.2 encontra-se o enquadramento geográfico do local e uma vista de parte do sapal.



Figura 3.2 - Enquadramento geográfico do sapal do rio Coina e vista de parte do sapal.

3.1.3. Procedimento de colheita e preparação dos exemplares

As plantas foram colhidas no dia 12 de Novembro de 2013 para o ensaio A e a 5 de Dezembro de 2013 para o ensaio B, ambos em período de maré baixa. Para o ensaio B, além das plantas, também foi recolhida água de estuário e sedimento (5 - 15 cm de profundidade) com proximidade geográfica das plantas. A matriz utilizada nas experiências laboratoriais foi previamente caracterizada em termos de pH, condutividade, percentagem de matéria orgânica e presença de contaminantes (PPCPs em estudo e/ou outros).

Foram seleccionadas duas espécies de plantas: *S. maritima* e *H. portulacoides*. Para ambos os ensaios as plantas foram colhidas com raiz.

Após a colheita, as plantas foram transportadas imediatamente para o laboratório, procedendo-se em seguida ao seu processamento (ver Figura 3.3). Esta fase consistiu em agrupar exemplares de cada espécie de acordo com o seu tamanho e biomassa (raiz e parte aérea), de modo a criar condições homogêneas no início dos ensaios. Para além dos tratamentos, para cada espécie de planta preparou-se dois controlos (sem contaminação).

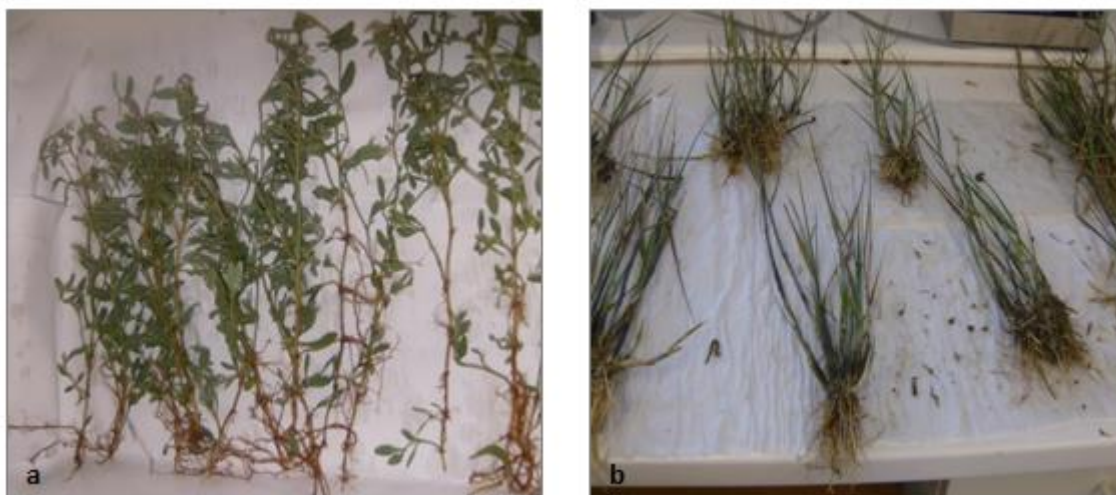


Figura 3.3 -Exemplares frescos de *H. portulacoides* (a) e *S. maritima* (b).

A massa total de espécie de plantas presente em cada tratamento nos ensaios A e B, encontram-se respetivamente nas Tabelas 3.1 e 3.2. Nas Figuras 3.4 e 3.5, é possível observar os exemplares de planta selecionados para cada tratamento (presença de contaminantes) e controlo de vitalidade das espécies de plantas (ausência de contaminantes).

Tabela 3.1 - Massa total de plantas por tratamento na presença de contaminantes (1, 2 e 3) e controlo de vitalidade (4, 5 e 6) no ensaio A

Espécie	Tratamento	Massa Total (g)
<i>S. maritima</i>	1	2,10
	2	3,00
	3	2,90
	4	2,30
	5	2,80
	6	2,67
<i>H. portulacoides</i>	1	6,70
	2	6,22
	3	6,10
	4	6,90
	5	6,60
	6	6,34



Figura 3.4 - Exemplos de *S. maritima* e *H. portulacoides* para o ensaio A.

Tabela 3.2 - Massa total de plantas por tratamento na presença de contaminantes (1 - 6) e controlo de vitalidade (7 - 9) no ensaio B

Espécie	Tratamento	Massa Total (g)
<i>S. maritima</i>	1	7,62
	2	8,96
	3	8,96
	4	8,39
	5	8,61
	6	9,24
	7	8,15
	8	9,00
	9	9,50
<i>H. portulacoides</i>	1	7,27
	2	6,90
	3	7,19
	4	7,33
	5	7,31
	6	6,70
	7	7,66
	8	8,30
	9	6,73

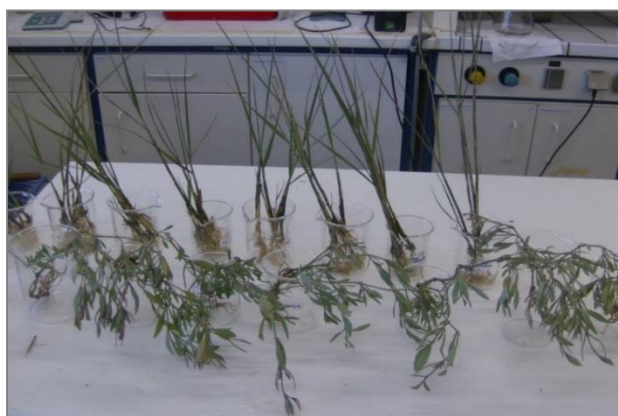


Figura 3.5 – *S. maritima* e *H. portulacoides* agrupadas para o início do ensaio B.

De modo a remover quaisquer partículas de sedimento ligadas à superfície e parar a atividade microbiana, as raízes das plantas de ambos os ensaios foram completamente lavadas com água desionizada e posteriormente submersas numa solução de NaClO a 8%, durante 1 minuto e 30 segundos. Em seguida, as raízes foram novamente lavadas com água desionizada durante aproximadamente 30 segundos para remover a solução desinfetante.

3.1.1.1. Ensaios de remoção de PPCPs

Os tratamentos foram fortificados com 1 mg L⁻¹ de TCS e 0,8 mg L⁻¹ de HMB. Para o ensaio em elutriado e elutriado com sedimento para além da HMB e do TCS, também se adicionou 1 mg L⁻¹ CAF. Embora a concentração dos compostos utilizada neste estudo seja 2 a 3 ordens de grandeza superiores às encontradas em efluentes, esta concentração foi escolhida para garantir a quantificação dos analitos alvo nas amostras das diferentes matrizes estuarinas e permitir a avaliação das condições de dispersão e mecanismos envolvidos na remediação potenciada pelas plantas.

Após a adição dos contaminantes a(s) solução(ões) (*Hoagland*, elutriado com e sem sedimento) foi agitada manualmente. Os ensaios foram realizados em escala laboratorial, tendo as plantas sido sujeitas a variações de temperatura diárias (mínima de 16 ± 1 °C e máxima de 20 ± 2°C).

Os ensaios tiveram a duração de 10 dias, sendo o valor de pH medido em intervalos regulares (a cada dois dias).

Após os 10 dias de exposição à matriz contaminada, as plantas foram secas à temperatura ambiente e pesadas.

3.1.3.2. Ensaio em solução de *Hoagland*

Após a preparação dos exemplares de plantas, estas foram colocadas numa solução hidropónica. Para tal, preparou-se uma solução de *Hoagland* adaptada (Fediuc and Erdei, 2002), com a seguinte composição química (os produtos químicos utilizados para a solução foram de grau analítico): 2,5 mmol L⁻¹ K⁺, 2 mmol L⁻¹ Mg²⁺, 2 mmol L⁻¹ Ca²⁺, 2 mmol L⁻¹ SO₄²⁻, 6 mmol L⁻¹ NO₃⁻, 0,5 µmol L⁻¹ H₂PO₄⁻, 10 µmol L⁻¹ Fe³⁺, 10 µmol L⁻¹ H₃BO₃, 1 µmol L⁻¹ Mn²⁺, 0,5 µmol L⁻¹ Cu²⁺, 0,1 µmol L⁻¹ MoO₄²⁻ (pH ajustado a 6,0). As plantas estiveram em período de

aclimação durante 1 mês, em laboratório, sendo a solução renovada duas vezes por semana.

A solução hidropônica (300 mL) foi fortificada com os PPCPs em estudo. Ao longo dos 10 dias, foi adicionada água desionizada quando necessário, de modo a manter os 300 mL de volume de amostra. Na Figura 3.6 é possível observar os tratamentos e os controles da planta, e na Figura 3.7 as raízes da *S. maritima* e *H. portulacoides* na matriz.



Figura 3.6 - Exemplares de *S.maritima*, *H. portulacoides* e respectivos controles no ensaio A.

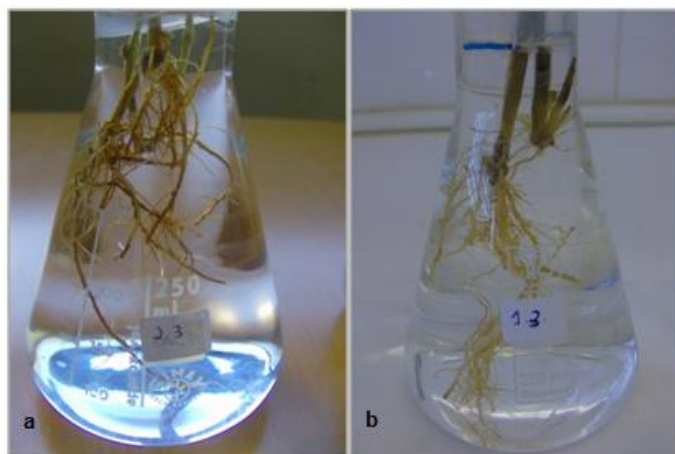


Figura 3.7 - Raízes de *H. portulacoides* (a) e *S. maritima* (b) em solução de Hoagland (ensaio A).

Para avaliar o efeito da remoção abiótica dos PPCPs adicionados, foram preparados dois controles sem planta, cada um com duas réplicas. Para os controles da fotodegradação, os matrizes de *Erlenmeyer* foram forrados com papel de alumínio impedindo a penetração da

luz. Na Tabela 3.3 segue o conjunto de parâmetros experimentais preparados para o ensaio A.

Tabela 3.3 - Parâmetros experimentais do ensaio A

	Planta	Contaminante
Controlo vitalidade da planta	x	-
Controlo fatores abióticos	-	x
Fotodegradação	-	x
Tratamento <i>S. maritima</i>	x	x
Tratamento <i>H. portulacoides</i>	x	x

3.1.3.3. Ensaio em elutriado e elutriado com sedimento

O segundo ensaio foi constituído por dois conjuntos: elutriado de sedimento, designado por elutriado (E), e sedimento embebido no respetivo elutriado, denominado por elutriado com sedimento (ES).

O E e o ES foram obtidos a partir da junção entre 300 mL de água do estuário e 50 g de sedimento húmido. De modo a promover a sua mistura, colocou-se no agitador orbital a 200 rpm durante 30 minutos, complementada por agitação manual a cada 10 minutos, de forma a assegurar uma mistura completa, de acordo com protocolos da EPA (USEPA, 1991).

Para o ES deixou-se a mistura assentar, obtendo-se assim, o elutriado com sedimento (ver Figura 3.8). Os restantes recipientes foram sujeitos a decantação e filtração com filtros de vidro de porosidade 5 µm, para remover partículas de matéria em suspensão e reduzir a presença de microorganismos, dando origem ao elutriado.

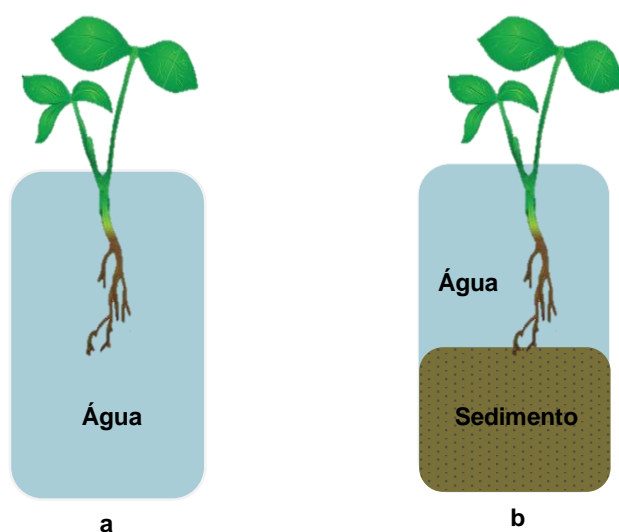


Figura 3.8 - Exemplo de tratamento em E (a) e ES (b).

Após a preparação da matriz, foi medido o pH e a condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$). Todos os tratamentos foram colocados dentro de uma caixa de cartão, de modo a simular um sistema real, isto é, sem a penetração da luz ao nível do substrato, diminuindo a possível fotodegradação dos compostos (ver Figura 3.9).

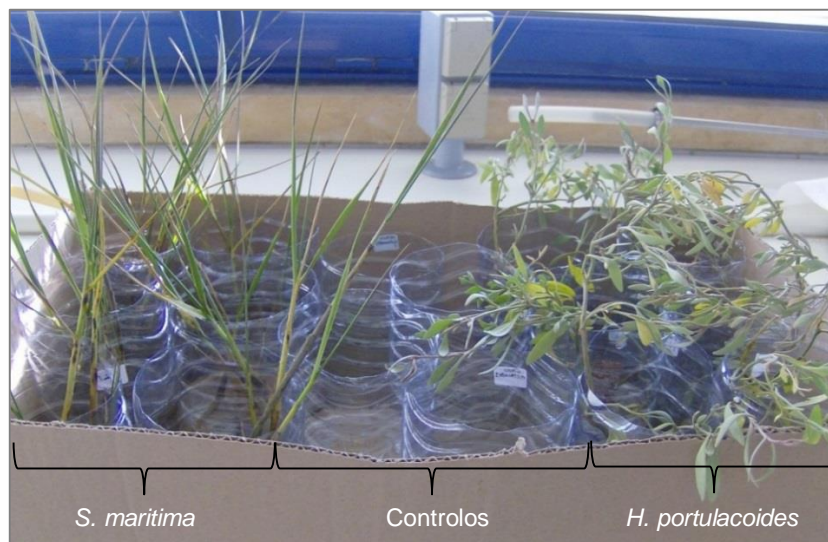


Figura 3.9 – Set-up experimental do ensaio B.

Na Tabela 3.4 segue o conjunto de parâmetros experimentais preparados para o ensaio B.

Tabela 3.4 - Parâmetros experimentais no ensaio B

	Planta	Contaminante	Matriz (E, ES)
Controlo vitalidade da planta	x	-	x
Controlo	-	x	x
Tratamento <i>S. maritima</i>	x	x	x
Tratamento <i>H. portulacoides</i>	x	x	x

Por forma a certificar que a CAF, TCS e HMB não adsorveram às paredes dos recipientes dos tratamentos, no final deste ensaio, passaram-se 6 mL de diclorometano (DCM) no recipiente e o extrato foi posteriormente analisado.

Estudo da exsudação/dessorção radicular

De modo a estudar a dessorção do contaminante às raízes e possível exsudação, no final do ensaio, as plantas foram colocadas em matrizes de *Erlenmeyer* com 200 mL de água do estuário, previamente filtrada, durante 2 dias.

3.2. Métodos analíticos

3.2.1. Reagentes e material

A CAF, HMB e TCS (Irgasan, $\geq 97\%$) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Os solventes utilizados no tratamento das amostras, DCM, metanol (MeOH) e acetona (ACE), foram de grau HPLC e obtidos a partir de Riedel-de Haën® (Alemanha). Todos os restantes solventes foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), Panreac (Barcelona, Spain) e Merck (Darmstadt, Germany). A água desionizada usada foi purificada com o sistema Mili-Q plus da Milipore.

Além do material corrente de laboratório, na preparação das soluções foram utilizados balões volumétricos de vidro Linex classe A (2 mL, 5 mL e 15 mL), pipetas graduadas e volumétricas de vidro Linex classe A (1 mL a 10 mL) e micropipetas LabNet (de 2 μL a 1000 μL). Foram também utilizados no processo de extração, frascos rolhados de 22 mL da Supelco.

Para prevenir a contaminação, todo o material de laboratório foi lavado com detergente adequado (Teepol), passado por água desionizada várias vezes (condutividade $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) seguido de MeOH.

3.2.2. Teor de clorofilas e carotenóides

No final de cada ensaio, seguiu-se uma metodologia de modo a analisar os pigmentos fotossintéticos das plantas: clorofilas (*a*, *b* e total) e carotenóides.

Os indicadores de *stress* das plantas, foram obtidos através da avaliação dos níveis de clorofila (*a*, *b*, total) e carotenóides das folhas das plantas. Cortaram-se pequenos fragmentos das folhas, cerca de $0,20 \pm 0,06$ g, os quais foram colocadas em tubos de ensaio com tampa, numa solução de 10 mL com 80 % de acetona (ver Figura 3.10a), durante 48 h a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os tubos foram agitados manualmente 2 vezes por dia durante 2 dias.

Após a incubação, as leituras foram realizadas em espectrofotómetro de *UV-Visible Thermo Spectronic Helios Gamma* (Figura 3.10) nos comprimentos de onda 430, 480, 647 664 e 750 nm.

Os teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides foram determinados a partir de expressões específicas, descritas por Lichtenthaler and Wellburn (1983):

$$[\text{Chl } a] = 12,21A_{663} - 2,81A_{646}$$

$$[\text{Chl } b] = 20,13A_{646} - 5,03A_{663}$$

$$[\text{Chl Total}] = (\text{Chl } a + \text{Chl } b)$$

$$\text{Carotenóides} = \frac{1000 A_{470} - 3,27\text{Chl } a - 104\text{Chl } b}{229}$$



Figura 3.10 - Extratos de planta em 80% de acetona (a) e espectrofotômetro (b).

3.2.3. Determinação de PPCPs

3.2.3.1. Preparação das amostras

Na Figura 3.11 segue a sequência de passos realizados para determinação dos contaminantes.

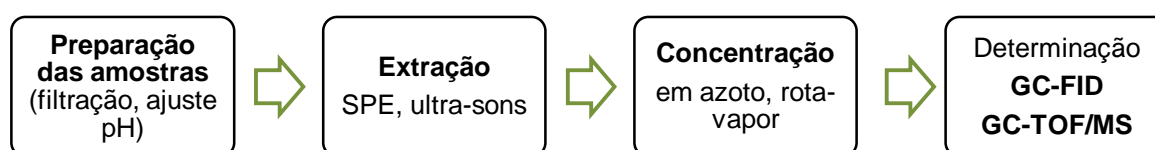


Figura 3.11 - Esquema sequencial do procedimento analítico.

3.2.3.2. Extração das amostras líquidas

Para ambos os ensaios, ao fim de 10 dias de tratamento, recolheram-se as matrizes líquidas e mediu-se o volume. Em seguida, foram acidificadas com ácido nítrico (HNO_3 , 1:1, v/v) a pH 2 e filtradas com filtros de vidro de 0,5 μm e extraídas por SPE (ver Figura 3.12).

Para a extração por SPE, foram usados cartuchos, OASIS® HLB 6cc (200 mg) da Waters (Saint-Quentin En Yvelines Cedex, France). Os cartuchos de SPE foram condicionados utilizando 3x6 mL de DCM seguidos de 3x6 mL MeOH e 3x6 mL água desionizada. Em seguida, cada cartucho foi percolado com 250 mL pela amostra a 5 mL min⁻¹. Por fim, deixou-se secar o cartucho durante 2-3 minutos e procedeu-se à eluição dos analitos com DCM. Para o ensaio A adicionou-se 2x2 mL e para o ensaio B 2x3 mL. O extrato foi posteriormente concentrado em fluxo de azoto até cerca 1 mL, devidamente rotulado e armazenado a -20°C até análise por cromatografia.

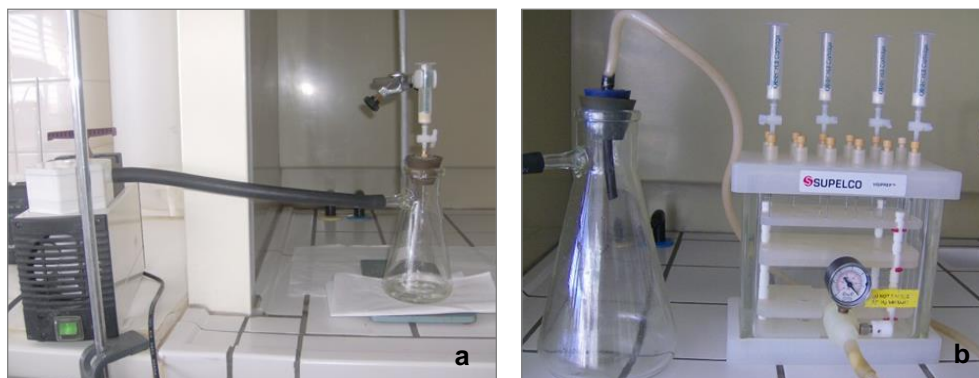


Figura 3.12 - Extração em fase sólida (a) e extração em fase sólida com *manifold* (b).

3.2.3.3. Extração de amostras sólidas

No ensaio B, para extração dos analitos da matriz sólida, deixou-se em primeiro lugar, o sedimento a secar à temperatura ambiente ao abrigo da luz, até atingir peso constante (ver Figura 3.13).

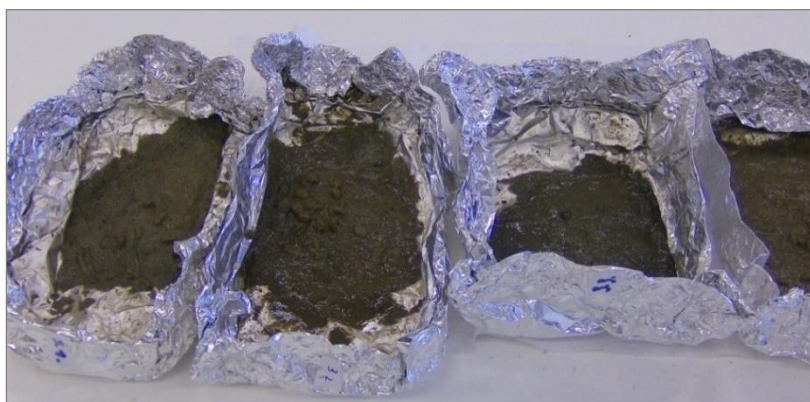


Figura 3.13 – Amostras de sedimento para secar ao abrigo da luz.

Após terem atingido peso constante, as amostras de sedimento foram maceradas (ver Figura 3.14 (a)) e procedeu-se à crivagem do sedimento (crivo de 2 mm), de modo a se obter uma mistura homogênea.

As etapas para extração do sedimento foram as seguintes (adaptado de Carvalho *et al.*, 2013):

1. Pesagem de 2 g de amostra (2 réplicas de cada extração);
2. Adição de 10 mL de MeOH:ACE (95:5) ao sedimento;
3. Extração por ultra-sons durante 15 minutos (Figura 3.14 (b)) à temperatura ambiente;
4. Decantação e filtração da amostra, com filtros de vidro de 0,5 µm;
5. Repetição dos passos 2, 3 e 4;
6. Combinação dos extratos;
7. Concentração da amostra em *rotavapor* (volume final cerca de 2-3mL) (Figura 3.14 (c));
8. Concentração até 1 mL em fluxo de azoto.

Todas as amostras foram devidamente rotuladas e armazenadas a -20°C até análise por cromatografia.

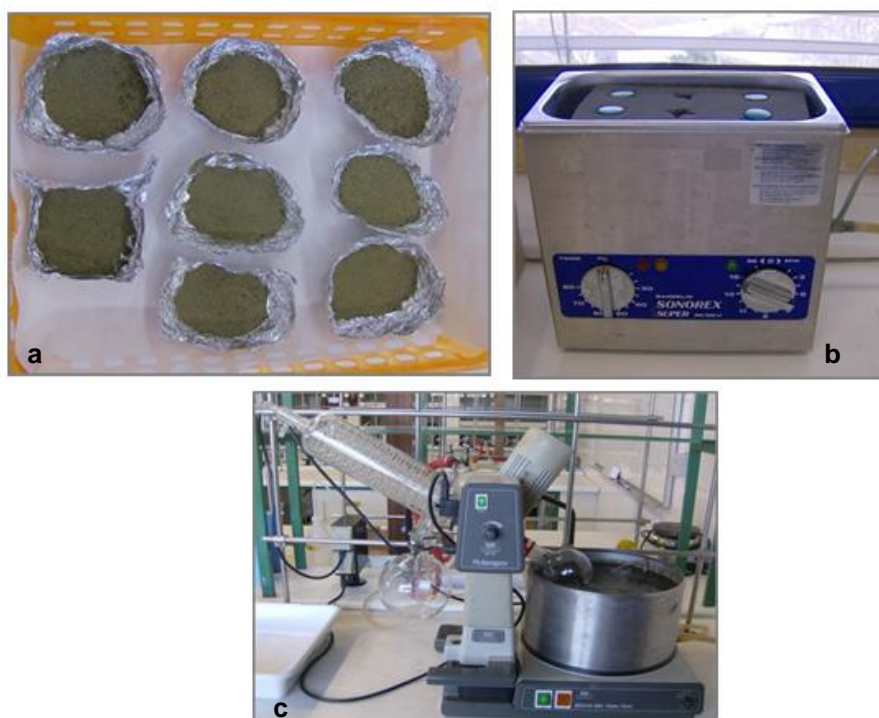


Figura 3.14 - Sedimento com peso constante para extração (a), ultra-sons (b) e concentração de amostras em *rotavapor* (c).

3.1.3.4. Análise de PPCPs

A quantificação dos compostos foi obtida através da co-injeção de padrões no GC-FID e a sua identificação através de GC-TOF-MS. No equipamento GC-FID (ver Figura 3.15), *ThermoQuest Trace 20000*, utilizou-se uma coluna capilar Zebron ZB-5MS, ou seja, revestida com uma fase não polar 5 % fenil e 95 % de dimetilpolissiloxano) com 30 m comprimento x 0.25 mm diâmetro interno x 0.25 µm espessura de filme. No equipamento de GC-TOF/MS

(espectrometria de massa com analisador por tempo de voo), *Micromass, modelo GCT*, utilizou-se uma coluna capilar com as mesmas características.



Figura 3.15 - GC-FID *ThermoQuest Trace 2000*.

O programa do forno da coluna encontra-se descrito na Tabela 3.5. Inicialmente injetou-se cada composto individualmente, de modo a registar os tempos de retenção, e definir o intervalo de tempos e temperaturas.

Tabela 3.5 - Parâmetros do método em GC para determinação de PPCPs

Tipo de injeção	Modo de injeção	Temp. de injeção (°C)	Fluxo de H ₂ (mL min ⁻¹)	Volume injetado (μL)	Etapa	Temp. (°C)	Rácio (°C/min)	Hold time (min)
Manual	<i>Splitless</i> (2 min)	250	1,6	1	Inicial	80	-	2
					Rampa 1	100	5	-
					Rampa 2	270	10	5
					Rampa 3 *	290	10	-

* Rampa 3 foi utilizada apenas para a massa

A CAF, HMB e TCS, foram detetados nos cromatogramas, a partir do tempo de retenção que é característico de cada composto. Os picos cromatográficos obtidos pelo GC-FID, foram integrados de modo a obter uma área no *software* Xcalibur. Para o GC/TOF-MS, os picos foram analisados utilizando o *software* Mass Lynx e a biblioteca NIST.

3.2.3.5. Ferramentas de validação

Calibração analítica

Foi realizada uma curva de calibração a partir de soluções-padrão com diferentes concentrações (1, 2,5, 5, 10, 40, 60 e 80 mg L⁻¹). As soluções-padrão foram diluídas em DCM,

a partir de uma solução-mãe preparada em ACE. A resposta do GC-FID foi analisada por variação da área dos picos.

Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limiares analíticos do método foram definidos a partir do cálculo do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) calculados pelas seguintes equações:

$$LOD = \frac{3,3 \times s}{m} \qquad LOQ = \frac{10 \times s}{m}$$

em que s é o desvio padrão da reta de calibração e m é o declive.

Controlo de qualidade

No início de cada dia de trabalho foi traçado um branco, para verificar se a coluna se encontrava limpa. Posteriormente realizou-se a injeção dos padrões de maior e menor concentração de modo a verificar se estes se encontravam dentro dos limites da reta de calibração e, portanto, se o declive da reta se mantinha. Foram também realizados em rotina testes com brancos e duplicados de amostras como ferramenta de controlo analítico.

Para o controlo de qualidade da metodologia analítica usada, uma vez que não havia material de referência certificado para os compostos em estudo, as matrizes experimentais (solução de *Hoagland*, sedimento e água estuarina) foram fortificadas com os padrões em estudo. Estas amostras foram posteriormente tratadas de forma semelhante às amostras experimentais e analisadas para determinação da recuperação do método.

3.3. Análise estatística

As diferenças estatisticamente significativas entre as amostras foram avaliadas a partir dos testes ANOVA com $p < 0.05$, seguido de Teste de *Tukey* utilizando o *software GraphPad Prism*.

Capítulo 4 - Resultados e discussão

4.1. Determinação de PPCPs

4.1.1. Ferramentas de validação

4.1.1.1. Calibração

Os valores para o coeficiente de determinação (R^2) das curvas de calibração devem ser o mais próximo possível da unidade, e não devem ser inferiores a 0,990 de forma a traduzir uma fraca dispersão dos resultados e um bom ajuste dos pontos experimentais à reta de calibração. O coeficiente de variação associado à calibração deve ser menor que 10% (ISO 8466-1).

Para o intervalo de concentrações estudado ($1 - 80 \text{ mg L}^{-1}$) verificou-se uma resposta linear. Na Figura 4.1 apresenta-se um dos cromatogramas obtidos para o padrão de 80 mg L^{-1} e nas Figuras 4.2, 4.3 e 4.4, as retas de calibração obtidas para a CAF, HMB e TCS, respetivamente.

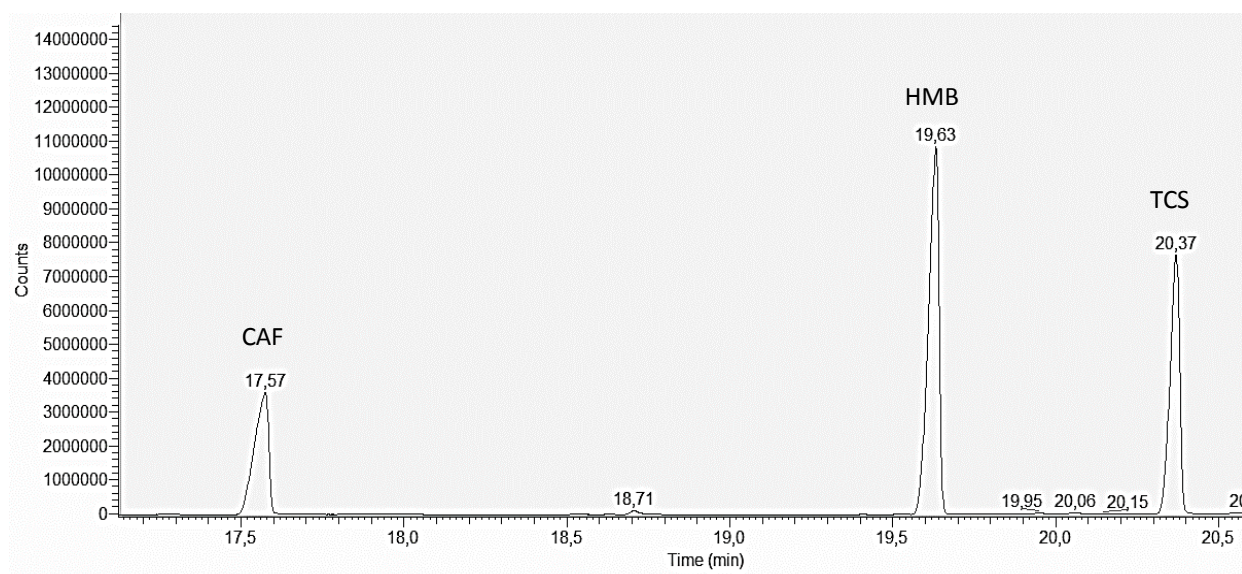


Figura 4.1 - Exemplo de um cromatograma do padrão de 80 ppm (CAF, HMB, TCS).

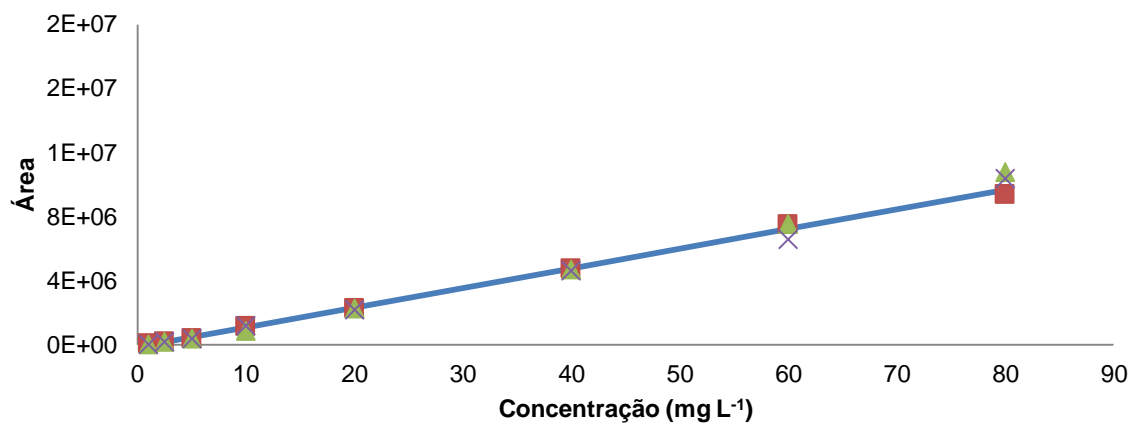


Figura 4.2 - Retra de calibração da CAF.

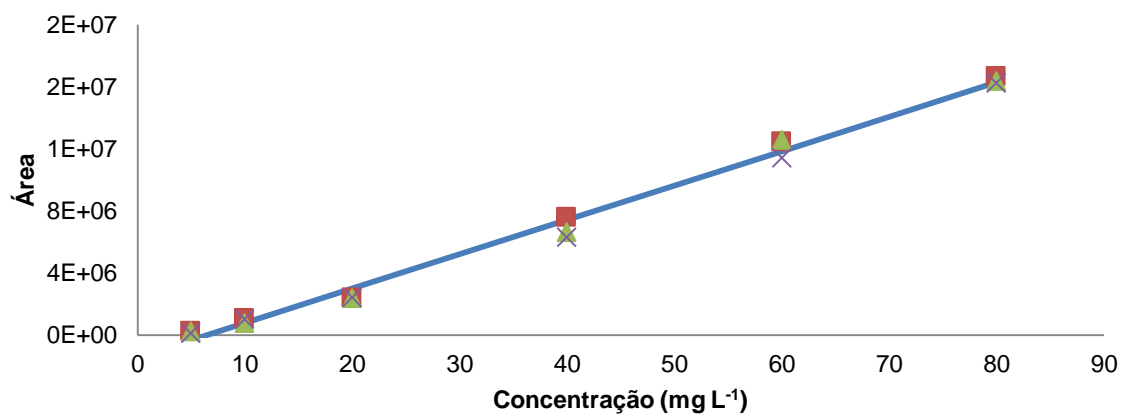


Figura 4.3 - Retra de calibração da HMB.

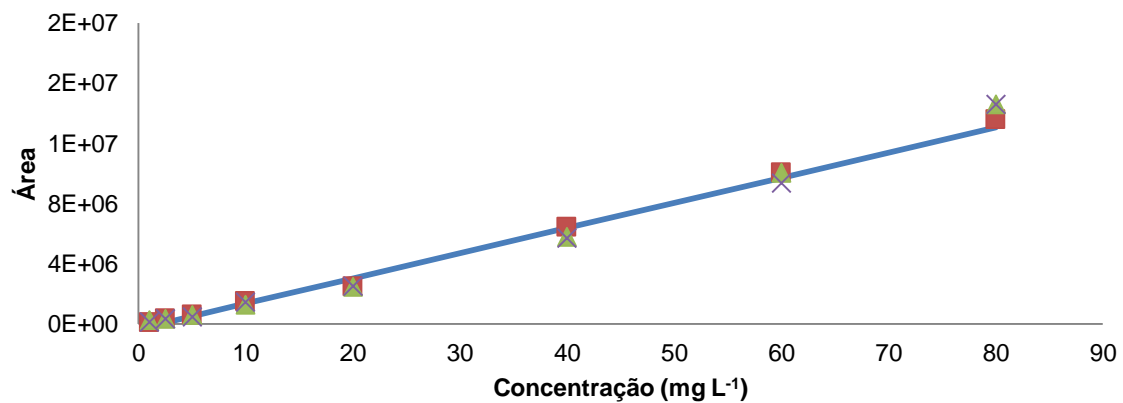


Figura 4.4 - Retra de calibração do TCS.

Pela análise da Tabela 4.1 conclui-se que os coeficientes de correlação das três retas são superiores a 0,990 e que os coeficientes de variação são inferiores a 10%, parâmetros que levaram à aceitação da calibração.

Tabela 4.1 - Características da reta de calibração para os três

Contaminante	Equação da reta de calibração	Coeficiente de correlação (R ²)	Coeficiente de variação (%)
CAF	$y = 122692x - 130778$	0,9999	1,8
HMB	$y = 221379x - 1417554$	0,9977	6,6
TCS	$y = 167525x - 328130$	0,9981	7,3

4.1.1.2. Limites de detecção e quantificação

A partir das equações expostas no capítulo 3 chegou-se aos valores de LD e LQ presentes na Tabela 4.2. Estes valores são cerca de duas ordens de grandeza superiores a valores observados na literatura (capítulo 1), embora em condições experimentais diferentes, para determinações de PPCPs em sedimentos e águas por GC-FID.

Tabela 4.2 - Limite de detecção e limite de quantificação em GC-FID para CAF, HMB e TCS

Contaminante	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
CAF	0,36	0,50
HMB	0,22	0,40
TCS	0,36	0,50

4.1.1.3. Recuperação do método

A recuperação do método para as amostras aquosas variou entre 84 a 120% para os três PPCPs, tendo sido inferior nas amostras sólidas como verificado em outros trabalhos, tal como, Carvalho *et al.*, (2013).

4.2. Ensaio em solução de *Hoagland*

4.2.1. Variação de pH e pigmentos fotossintéticos

No ensaio em solução de *Hoagland*, o pH inicial dos tratamentos foi de 6,0 (pH ajustado no início do ensaio). Ao longo dos 10 dias desceu em todos os tratamentos até 0,5 valores. Esta

solução apresentou uma condutividade 1000 vezes superior à da água desionizada ($1002 \mu\text{S cm}^{-1}$ vs. $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$).

Embora as plantas tenham a capacidade de absorver e degradar muitos compostos, também são sensíveis a muitos deles. A resposta da planta em relação ao *stress* provocado pela presença dos contaminantes, pode alterar a sua capacidade de remediação, p.e. absorção. Mas um aumento de absorção do contaminante pode, por vezes, causar problemas graves na vitalidade da planta. Os efeitos dependem do contaminante, da espécie da planta, e da concentração e tempo de exposição (Davis *et al.*, 2002 *in* Almeida *et al.*, 2008).

No presente estudo, os níveis de clorofilas (*a*, *b*) e carotenóides permitiram avaliar o nível de *stress* nas plantas após a exposição aos contaminantes. Na Figura 4.5 encontram-se os valores de clorofilas (*a*, *b*) e carotenóides para a *S. maritima* e *H. portulacoides*, assim como, para os respetivos controlos. Em ambas as espécies os valores de carotenóides mantiveram-se constantes mas verificou-se uma tendência de descida das clorofilas *a* e *b* em relação aos controlos, contudo sem diferenças estatísticas significativas entres eles ($p > 0,05$). Desta forma, pode-se concluir que a concentração de contaminantes à qual as plantas estiveram expostas ($0,8 - 1,0 \text{ mg L}^{-1}$) não as afetou negativamente.

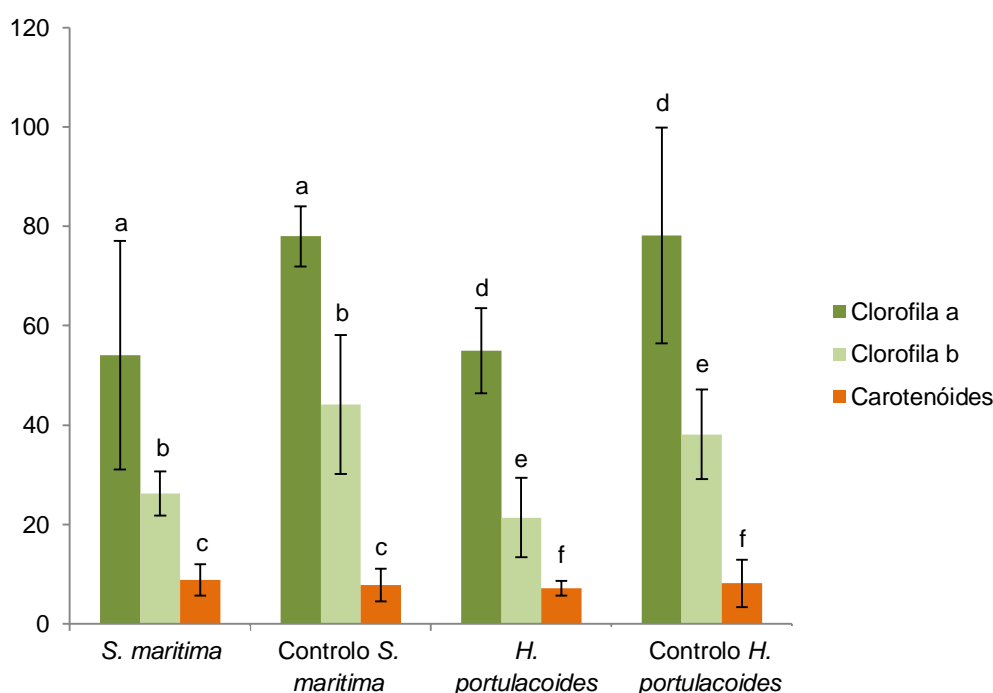


Figura 4.5 - Teor de clorofilas (*a*, *b*) e carotenóides (valores médios e desvio padrão, $n = 3$) ao fim de 10 dias de ensaio em solução de Hoagland (ensaio A) para cada espécie de planta e respetivo controlo. As mesmas letras significa que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) em comparação com o respetivo controlo.

Na Figura 4.6 encontram-se as percentagens [normalizadas em relação ao controlo (valores médios, $n=3$)] de contaminantes que permaneceram na solução de *Hoagland* ao fim de 10 dias de tratamento. Sendo que na remoção dos contaminantes estão envolvidos um conjunto complexo de fatores abióticos e bióticos, o controlo permitiu avaliar perdas abióticas como volatilização, mas não fotodegradação uma vez que não esteve exposto à luz (forrado com papel de alumínio). Relativamente à volatilização, com base na constante de *Henry* da HMB ($1,50 \times 10^{-8} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$) e do TCS ($2,4 \times 10^{-7} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$) não se espera que este mecanismo de remoção de contaminante tenha ocorrido na matriz líquida.

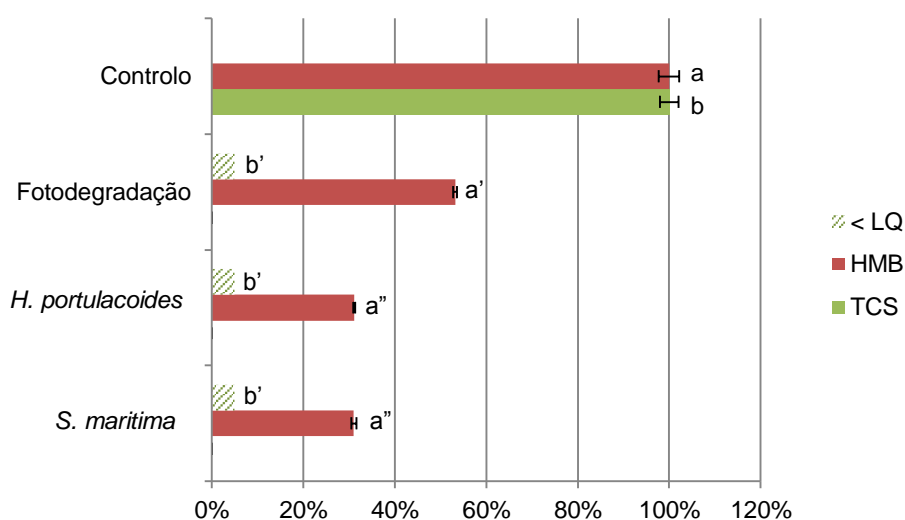


Figura 4.6 - Percentagem normalizada ao controlo, de HMB e TCS presente na solução de *Hoagland* (ensaio A) ao fim de 10 dias ($n=3$). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A concentração final de contaminantes, HMB e TCS, apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na presença e na ausência de plantas, contudo os comportamentos de remediação foram semelhantes entre as espécies *H. portulacoides* e *S. maritima*. Segundo a Pubchem (2014), a HMB é um composto suscetível à fotodegradação, pois absorve luz a 288 e 326 nm, sendo considerado um composto moderadamente fotodegradável na presença de radiação solar. Neste ensaio em solução de *Hoagland*, no controlo da fotodegradação a remediação foi de 47% e na presença das plantas de 69%, indicando que a planta potenciou a remediação de HMB em 22%. Devido à hidrofobicidade da HMB ($\text{Log } K_{ow} = 3,8$), tal como o TCS ($\text{Log } K_{ow} = 4,76$), não se espera que estes compostos tenham sido absorvidos pela planta, mas que possivelmente tenham adsorvido à raiz e que aí possam vir a ser degradados. O TCS só foi detetado no controlo das perdas abióticas, estando abaixo do limite de deteção nas restantes amostras. Constata-se assim, que a exposição à luz solar resultou em remoções consideráveis devido à fotodegradação. Este resultado coincide com os da literatura, onde se

verifica que este composto é altamente fotodegradável, sendo o principal mecanismo de remoção a degradação por ação dos UV (Vione *et al.*, 2013; WFD-UKTAG, 2009; Lindstrom *et al.*, 2002). Um estudo realizado por Matamoros *et al.* (2012) em solução hidropônica atribuiu 80% de remoção do TCS à fotodegradação, sendo os restantes 20% atribuídos a biodegradação. Contudo, na presente fase do estudo, não se esperava que a biorremediação fosse um mecanismo de remediação preferencial dado que as raízes foram passadas por uma solução de NaClO de modo a parar a atividade dos microorganismos associados às raízes das plantas presentes no estuário do Tejo.

4.3. Ensaio em elutriado e elutriado com sedimento

4.3.1. Caracterização do sedimento e água de estuário

Os tratamentos em E e ES apresentaram pH neutro (7,7). Os valores de condutividade em E e ES no início da experiência foram de $56,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ e $56,5 \mu\text{S cm}^{-1}$, respetivamente. A partir destes valores, constata-se que a matriz em estudo contém iões dissolvidos, tal como NaCl. A percentagem média de matéria orgânica presente no sedimento foi de 2,8.

A caracterização inicial dos sedimentos utilizando GC-FID permitiu observar que não existia contaminação por CAF, HMB e TCS ($\text{LD} = 0,36 \text{ mg L}^{-1}$ para CAF e TCS e $0,22 \text{ mg L}^{-1}$ para HMB). Contudo, uma análise qualitativa efetuada por GC-TOF/MS revelou a presença de contaminação por HAPs. Apesar da matriz se encontrar contaminada no meio natural optou-se por manter esta matriz “real”, fortificando-a com os PPCPs em estudo, de modo a poder simular uma entrada abrupta destes contaminantes no ambiente natural, já de si contaminado.

4.3.2. Variação de pH e pigmentos fotossintéticos

Nos tratamentos com planta houve uma descida até 7,3, em ambas as matrizes. O mesmo foi verificado para os controlos em ES. Nos controlos em E o pH subiu até 8,14. Os valores de pH podem ser alterados a partir da libertação de exsudados das raízes ou através da produção de dióxido de carbono (CO_2), teor de humidade e temperatura ou ainda pelas características do contaminante (EPA, 2000). Neste caso, constata-se que as variações de pH estarão associadas à presença de sedimento e à libertação de compostos existentes no mesmo.

Nas Figuras 4.7 e 4.8, encontram-se os teores ($\mu\text{g g}^{-1}$) de clorofilas (*a*, *b*) e carotenóides, para o ensaio em E e ES, respetivamente. Tal como no ensaio em solução de *Hoagland*, as plantas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) em relação aos

respetivos controlos, indicando assim, que a presença dos contaminantes não resultaram num mecanismo desencadeador de *stress* nas espécies em estudo.

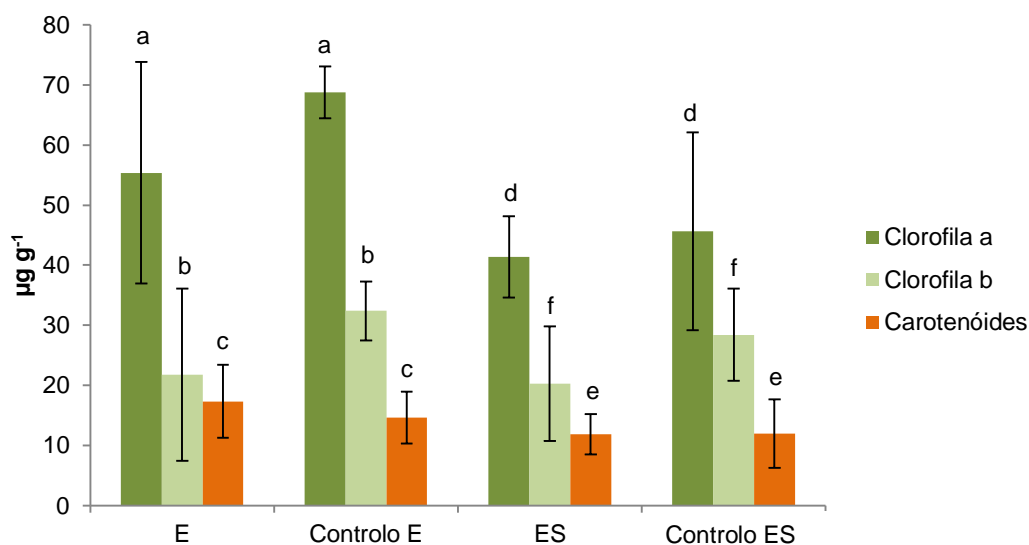


Figura 4.7 - Teor de clorofilas (a, b) e carotenóides (valores médios e desvio padrão, n = 3) ao fim de 10 dias no ensaio B para a espécie *S. maritima*. As mesmas letras significa que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) para o mesmo ensaio (E e ES).

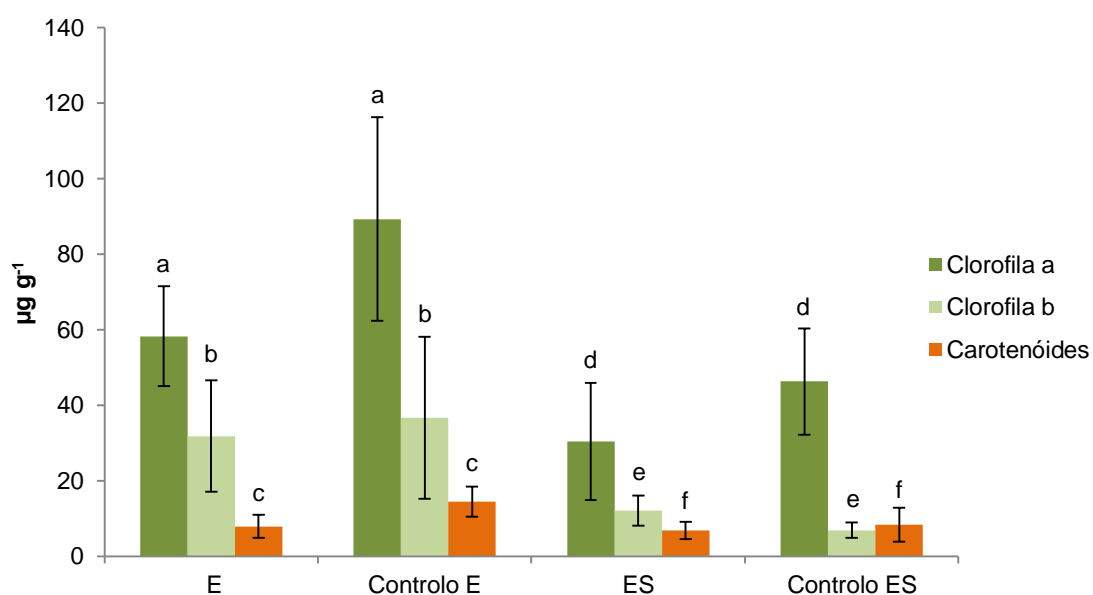


Figura 4.8 - Teor de clorofilas (a, b) e carotenóides (valores médios e desvio padrão, n = 3) ao fim de 10 dias no ensaio B para a espécie *H. portulacoides*. As mesmas letras significa que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) para o mesmo ensaio (E e ES).

Com o objetivo de estudar a dinâmica de remediação/movimentação dos contaminantes foram analisadas as seguintes frações: líquida para o ensaio com E; líquida e sólida para o ensaio ES. Em ambos os casos, foram analisados os exsudados/dessorções de contaminante da

planta, resultantes da sua re-introdução em água do estuário durante 2 dias, após o final da exposição aos contaminantes. As massas de contaminantes encontradas nas diferentes matrizes no final da experiência são comparadas com a massa adicionada no início da experiência: 0,3 mg para a CAF e TCS e 0,24 mg para a HMB, de modo a se obter percentagens de remoção. Na Figura 4.9 encontra-se os valores médios (n=3) de cada contaminante, presente na fração líquida dos tratamentos E e ES.

De salientar que, tanto nos tratamentos E como ES, os efeitos da fotodegradação foram minimizados dado que a parte lateral dos recipientes foi tapada, ficando assim a solução protegida da radiação UV. No entanto, não se garante que a radiação não tenha incidido no topo das matrizes proporcionando, até alguma extensão, a fotodegradação dos contaminantes. Quanto aos restantes fatores abióticos, consideram-se baixos ou mesmo insignificantes, pois a adsorção dos compostos às paredes dos recipientes foi cerca de 0,02% sendo a volatilização desprezível para os três contaminantes (constante de *Henry* da CAF: $3,58 \times 10^{-11} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$).

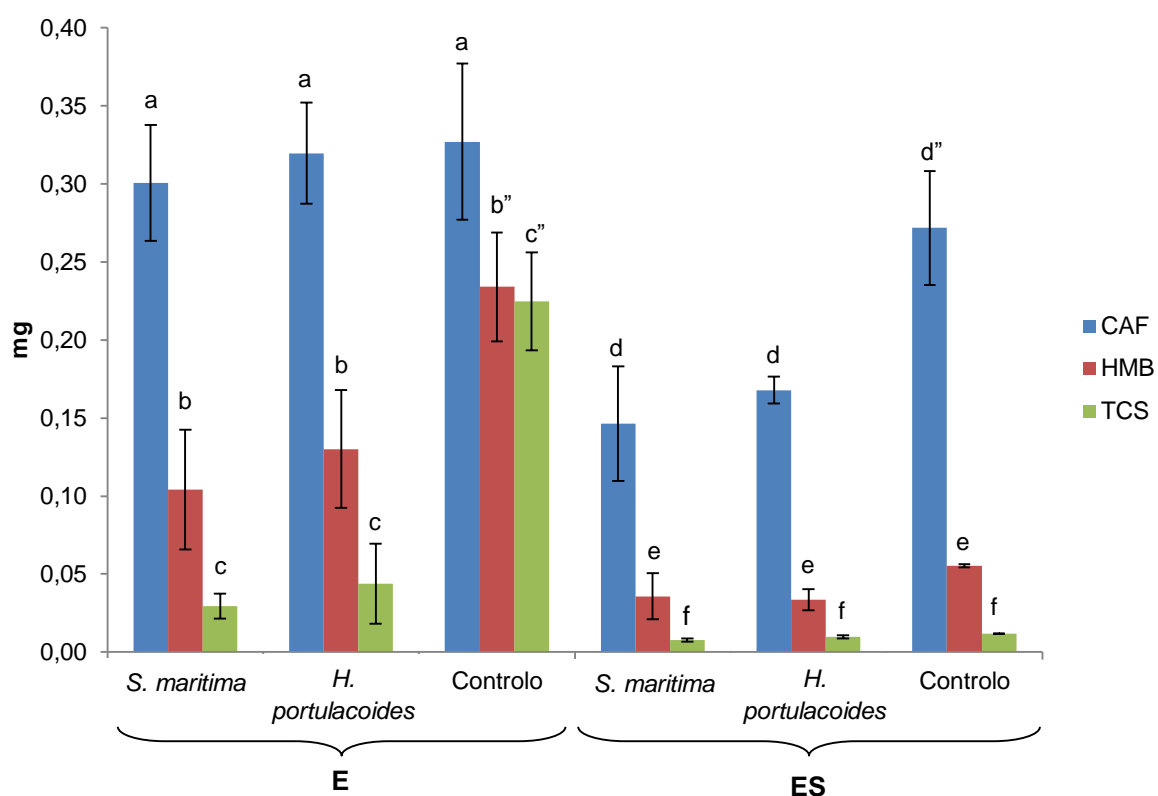


Figura 4.9 - Massa (valor médio e desvio padrão, n=3) de contaminante presente na fase líquida em E e ES ao fim de 10 dias no ensaio B. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para o mesmo ensaio (E e ES).

4.3.3. Remediação na matriz elutriado

Em elutriado (E), a CAF não apresentou valores de remediação significativos mesmo na presença da planta, sendo que apenas 5% da concentração inicial foi libertada no estudo dos exsudados/dessorção da raiz (ver Figura 4.10). Este resultado é coincidente com o estudo de Burken e Schnoor (1998), em que é descrito que os compostos hidrofílicos ($\text{Log } K_{ow} < 1$), tal como a CAF ($\text{Log } K_{ow} = -0,77$), não serão absorvidos de forma significativa pelas plantas. No entanto, estudos recentes têm demonstrado o contrário. Dettenmaier *et al.* (2009) e Zhang *et al.* (2013b) mostraram que os compostos orgânicos solúveis muito hidrofílicos, como a CAF, são os mais propensos a serem absorvidos pelas raízes das plantas e translocados para os tecidos. Estes dados levaram a um novo modelo de potencial de absorção radicular pela planta, que prevê que compostos com $\text{Log } K_{ow} < 0,5$ apresentem o maior potencial de absorção radicular e de translocação. No presente estudo, a baixa absorção não poderá ser explicada devido ao intervalo de tempo considerado (10 dias) dado que a absorção da CAF tem sido reportada para intervalos de tempo mais curtos (3 dias) (Zhang *et al.*, 2013b).

Ao contrário da HMB e do TCS, a fotodegradação da CAF não foi testada durante este trabalho (no primeiro ensaio só foi testada para a HMB e o TCS dado que a escolha da CAF surgiu na segunda fase do trabalho). Contudo, contrariamente à HMB e TCS, não será de esperar que a fotodegradação tenha uma influência significativa na degradação deste composto, pois não absorve luz a comprimentos de onda superiores a 290 nm (Pubchem, 2014). Os resultados obtidos por Zhang *et al.* (2013b), em solução de *Hoagland*, mostram que apenas 1,9% e 2,9% da concentração inicial de CAF (1 mg L^{-1}) foram remediados por fotodegradação ao fim de 3 e 7 dias, respetivamente.

Quanto à HMB, o controlo apresentou 3% de remediação devido a fatores abióticos. A fotodegradação terá influenciado a remoção contudo, em menor extensão em relação à obtida no ensaio em solução de *Hoagland* pelos motivos atrás indicados, ou seja, neste caso os tratamentos foram tapados de modo a impedir a penetração da luz. Cerca de 50% de remediação foi potenciada pela planta, sendo que a *S. maritima* foi ligeiramente mais eficiente do que a *H. portulacoides* (54% vs. 43%). No estudo dos exsudados (ver Figura 4.10), observou-se que o contaminante saiu da zona radicular numa percentagem média de 13% (14% *S. maritima* e 12% *H. portulacoides*). Como este valor é inferior ao que foi remediado, pode sugerir que o contaminante não tenha sido totalmente libertado pela raiz ou que, de algum modo, parte da sua remediação pudesse ter ocorrido sido estimulada a nível radicular durante os 10 dias de tratamento.

Para o TCS, o controlo apresentou uma percentagem de remediação semelhante à da HMB, 25%, potenciada também pela fotodegradação. No entanto, o efeito das plantas na remediação foi mais visível no caso do TCS do que na HMB. Com efeito, a planta potenciou a remediação em 65% *S. maritima* e 60% *H. portulacoides*. No estudo de exsudação/dessorção radicular, cerca de 6% de TCS (7% *S. maritima* e 5% *H. portulacoides*) foi libertado da zona radicular (uma menor percentagem em relação ao valor de HMB). Na Figura 4.10 apresentam-se as massas médias (n=3) dos três contaminantes exsudados/dessorvidos pelas raízes das plantas.

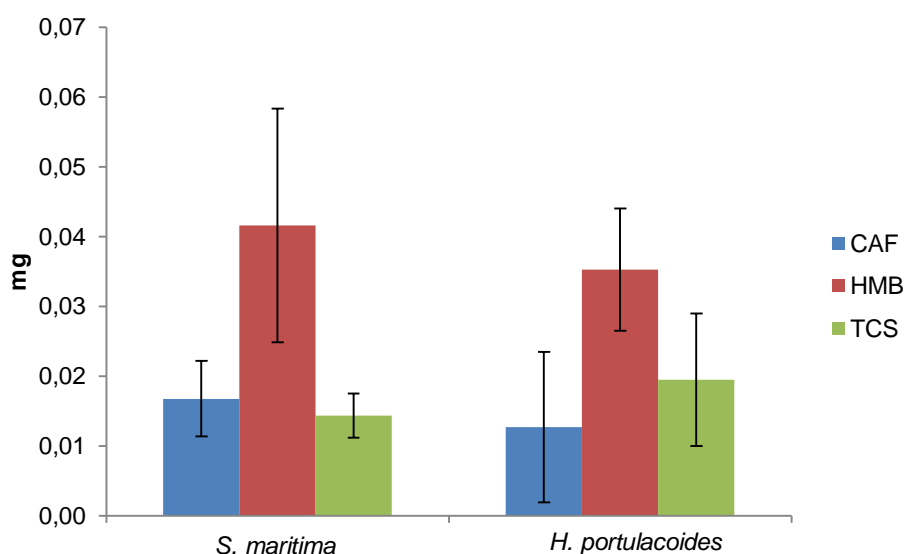


Figura 4.10 - Massa (valores médios e desvio padrão, n=3) de contaminantes exsudados/dessorvidos pela raiz em elutriado por *S. maritima* e *H. portulacoides* no ensaio B.

Os resultados obtidos no presente trabalho conduzem ao potencial da planta na remediação dos contaminantes em análise, principalmente do TCS, visto que estes são hidrofóbicos ($\text{Log } K_{ow} > 3$), e por isso não são suscetíveis de entrar para a planta, como explicado atrás na secção relativa ao ensaio em solução de *Hoagland*. Assim sendo, a ação da planta como agente potenciador da remediação estará ligada à superfície radicular e respetiva zona envolvente. Apesar de a água do estuário ter sido filtrada e de as raízes das plantas terem sido lavadas com NaClO, o controlo não foi esterilizado e não se pode garantir a ausência de biorremediação destes compostos. Este poderá ser um dos mecanismos que justificam o facto de o TCS ter sido o composto com maior percentagem de remediação no tratamento com plantas, mas com menor percentagem de libertação pela raiz.

4.3.4. Remediação na matriz elutriado com sedimento

Neste ensaio, para além da fração líquida e da exsudação/dessorção de contaminantes pela planta, também se avaliou os níveis de contaminante no sedimento.

A CAF, ao fim de 10 dias de tratamento, permaneceu no controlo numa proporção de 4:1 entre a fase líquida e sedimento, facto explicado pela sua solubilidade ($2,16 \times 10^4 \text{ mg L}^{-1}$) e $\text{Log } K_{ow}$ (-0,07). Mesmo na presença de plantas, a percentagem de CAF no sedimento, foi semelhante à do controlo (aprox. 20%). No entanto, na fração líquida, foram detetados 56% e 49% de CAF na presença de *H. portulacoides* e *S. maritima*, respetivamente, o que conduz ao potencial da planta na remediação deste contaminante, em cerca de 20%, em comparação com o controlo (83%). Ainda assim, tal como nos ensaios anteriores, este contaminante continuou a ser o menos removido de entre os três em estudo. Contudo, neste ensaio a simulação do meio natural pareceu estimular mais a remediação da CAF, um comportamento oposto ao verificado na matriz filtrada sem a presença de sedimento (E). Segundo Matamoras *et al.* (2012), os principais mecanismos de remoção da CAF são a biodegradação (35%) e/ou absorção pela planta (60%). No estudo de exsudação/dessorção, a planta voltou a libertar uma baixa percentagem de CAF, o que sugere que esta poderá ter sido a percentagem que terá ficado adsorvida à raiz. A remediação da restante CAF, terá sido proporcionada pela ocorrência de biorremediação estimulada pelos microorganismos presentes no sedimento. A CAF tem sido relatada como facilmente biodegradável em efluentes (Pubchem, 2014). Para além da biorremediação, os organismos presentes no sedimento, podem ter estimulado a degradação na rizosfera através da libertação de exsudados radiculares (p.e. açúcares, e aminoácidos) (Zhang *et al.*, 2010a; Cunningham and Berti, 1993).

Relativamente à HMB, não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre a quantidade de contaminante que permaneceu na fração líquida na presença (aprox. 15% ambas as espécies) ou na ausência da planta (23%). No entanto, ao analisar o sedimento, constata-se que o controlo apresentava 90% de HMB, enquanto que nos restantes tratamentos a presença foi de 50% para *S. maritima* e 39% para a *H. portulacoides*. A percentagem de contaminante existente no sedimento foi menor na presença de plantas dado que estas poderão ter estimulado a bio-/rizoremediação dos contaminantes. Este "efeito rizosfera" é originado por processos físicos (p.e. trocas gasosas) e químicos (exsudados) através da interação das raízes das plantas no sedimento (McCully *et al.*, 1999). Este habitat favorável para os microrganismos na zona radicular das plantas pode levar a um aumento da degradação dos contaminantes por microrganismos do solo. Este processo de fitodegradação pode ser aplicado a uma grande variedade de contaminantes, incluindo aqueles que, devido às suas propriedades físico-químicas, não são absorvidos pelas plantas ou apenas em quantidades muito baixas (Reichenauer and Germida, 2008), tais como a HMB e TCS.

Na Figura 4.11 podem ser observadas as massas (valor médio e desvio padrão, $n=3$) dos contaminantes presentes no sedimento no final do tratamento.

Aparentemente, o TCS teve o mesmo comportamento que a HMB. Este contaminante também não apresentou diferenças entre a fase líquida com e sem planta (aprox. 3%), uma vez que, ao analisar o sedimento, observou-se que o controlo apresentava 56% de contaminante, enquanto que nos tratamentos vegetados a presença foi de cerca de 27% para ambas as espécies de planta. A dessorção destes compostos por ambas as espécies de plantas, como se verá mais à frente, foi mais baixa que nos ensaios com apenas elutriado (E).

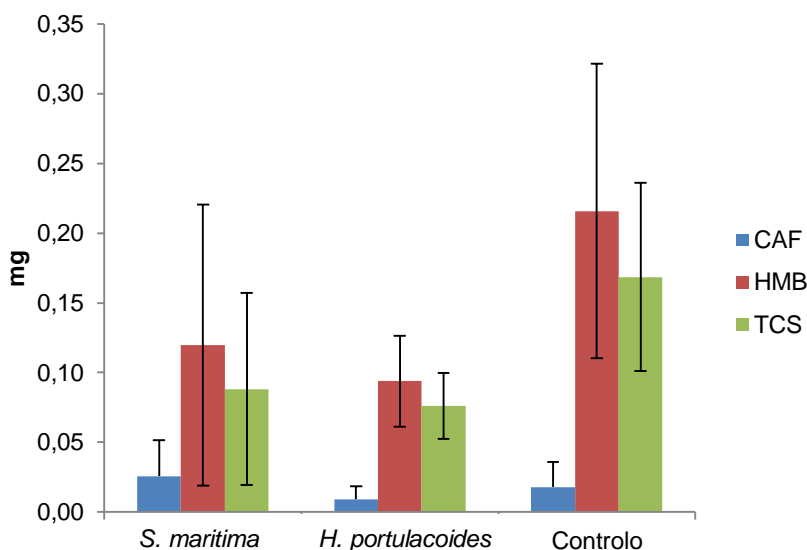


Figura 4.11 - Massa (valor médio e desvio padrão, n=3) de contaminante (CAF, HMB, TCS) presente no sedimento após 10 dias no ensaio B.

Como referido anteriormente, a matriz já se encontrava contaminada com HAPs. A Figura 4.12 mostra o cromatograma do sedimento vegetado (no final das experiências) apresentando contaminação mista, ou seja, com os PPCPs (adicionados inicialmente aos tratamentos) e os HAPs presentes na matriz ambiental. Não se espera que estes HAPs tenham influenciado significativamente a remediação dos PPCPs já que estariam fortemente adsorvidos ao sedimento e, portanto, pouco biodisponíveis (idade da contaminação). Em anexo seguem informação suplementar relativamente aos espectros da CAF, HMB e TCS.

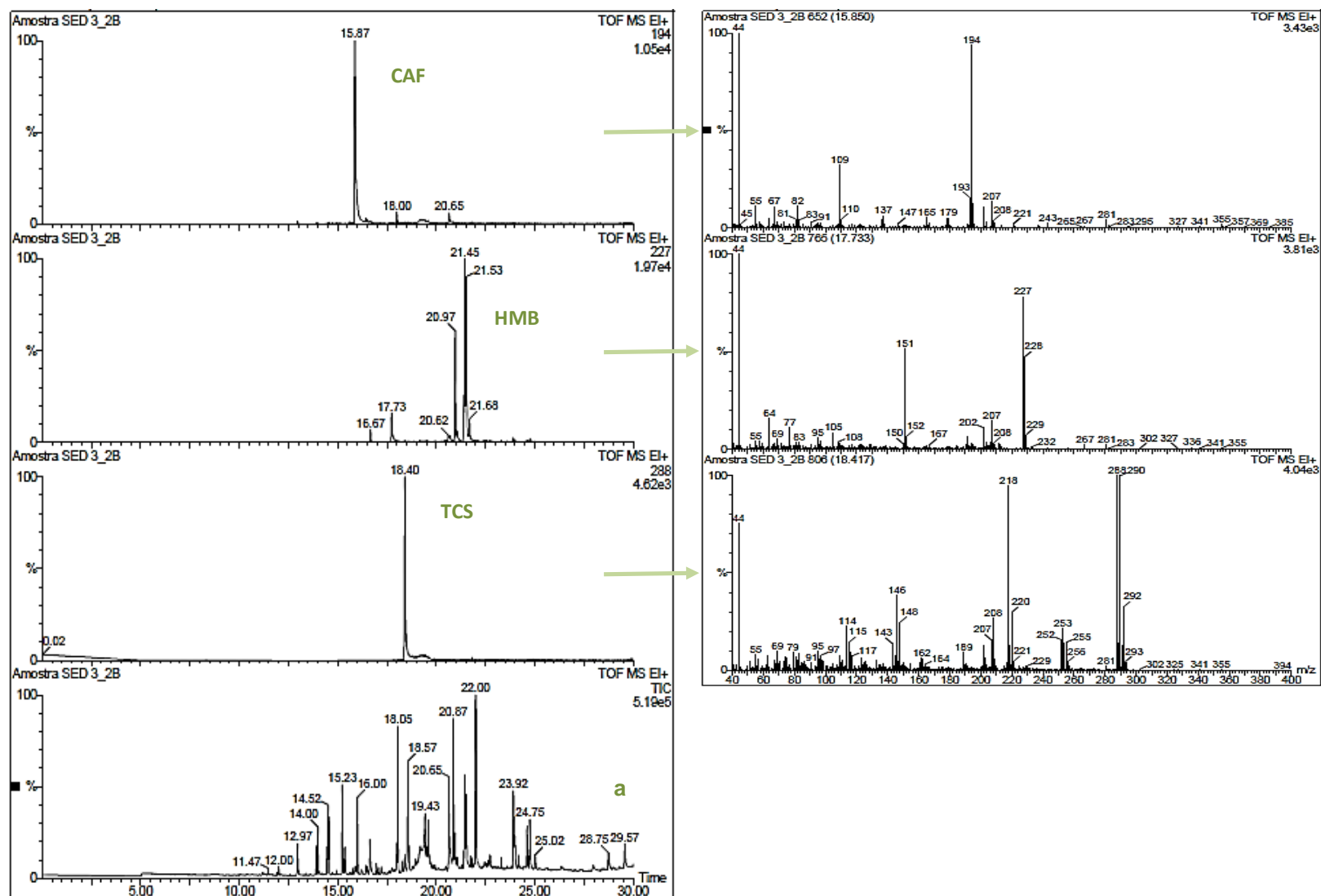


Figura 4.12- Cromatogramas obtidos por GC-TOF/MS para uma amostra de sedimento (a) com **extração de ião** (à esquerda): 194 correspondente à CAF, 277 à HMB, 288 ao TCS e respectivos **espectros de massa** (à direita).

A nível de dispersão de contaminantes para o sedimento, os compostos presentes em maior quantidade nesta matriz, são os que apresentam menor solubilidade: HMB (69 mg L⁻¹) e TCS (10 mg L⁻¹), em comparação com a CAF (2,16x10⁴ mg L⁻¹). Estes compostos, com base nos valores do Log K_{oc}, HMB = 2,7 e TCS = 3,96, tendem a adsorver ao sedimento, apresentando uma baixa mobilidade no mesmo (Pubchem, 2014; Magi *et al.*, 2012). Quanto à CAF, quando libertada na água, não se espera que fique adsorvida aos sólidos suspensos e sedimentos (Log K_{oc} = 1), mas que solubilize, tendo, por isso, sido detetado em menor quantidade neste compartimento.

Em relação ao estudo de exsudação/dessorção dos contaminantes, a partir da análise da Figura 4.13, verifica-se que para a CAF a exsudação/dessorção pela planta foi semelhante nas duas matrizes. No entanto, as plantas que estiveram nos tratamentos com E libertaram uma maior quantidade de HMB e TCS (14% e 5% para *S. maritima*, 12% e 7% para *H. portulacoides*) em relação às plantas que estiveram com ES (5% HMB e 3% TCS por *S. maritima*, 1% e 1% para *H. portulacoides*). Este resultado pode ser justificado, pela disponibilidade dos contaminantes que terá sido mais elevada na ausência da fase sólida (sedimento), dado que os contaminantes são pouco solúveis e tendem a adsorver ao sedimento (com base no valor de Log K_{oc}).

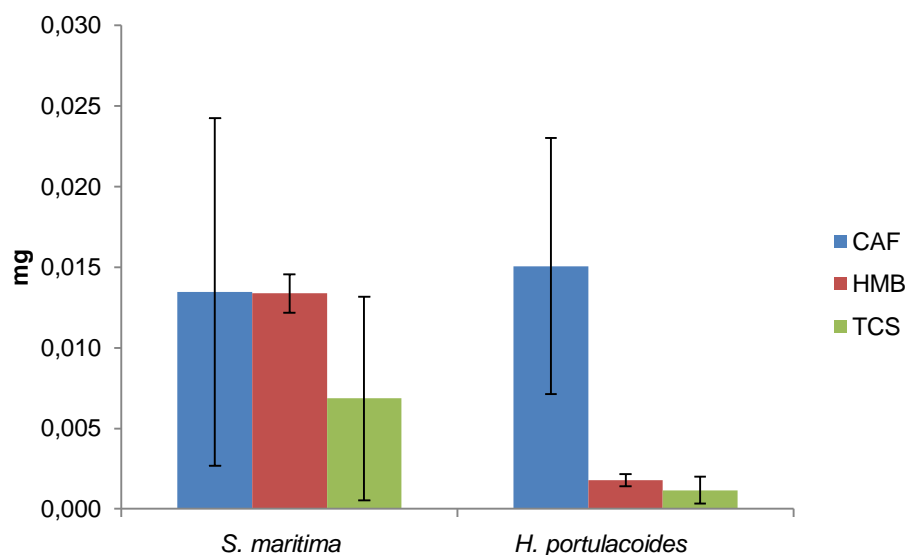


Figura 4.13 - Massa (valores médios e desvio padrão, n=3) de contaminante exudados/dessorvidos da raiz no ensaio em elutriado com sedimento (ensaio B) por *S. maritima* e *H. portulacoides*.

Assim, é possível constatar que o destino dos contaminantes é influenciado pela adsorção ao sedimento, o que por sua vez influencia a distribuição no meio aquoso e, consequentemente, o destino final dos contaminantes (Bui and Choi, 2010). A CAF, tende a ficar na fase líquida, enquanto que a HMB e o TCS tendem a adsorver à planta e ao sedimento (quanto presente).

Para além de ficarem adsorvidos, os contaminantes podem sofrer biorremediação (e/ou rizorremediação) tendo sido relatada como um potencial mecanismo de remoção, principalmente para a CAF, sendo que a biodegradação da HMB e TCS é lenta nesta matriz (Pubchem, 2014). Em específico, para o TCS, um estudo realizado por Ying *et al.* (2007) afirma que a degradação deste composto é muito lenta sob condições anaeróbias, tendo sido encontrado em sedimentos com 30 anos de idade no Lago Greifensee (Zhao *et al.*, 2010). Também a biodegradação de HMB no sedimento deverá ser lenta tendo em conta a degradação de 4% após 28 dias num teste laboratorial, utilizando um inóculo de lamas ativadas (Pubchem, 2014).

Independentemente da velocidade de remediação, e caso esta não seja completa (mineralização), os produtos de degradação podem ser mais tóxicos do que os contaminantes inicialmente presentes. No final da experiência não foram detetados produtos de degradação ou intermediários da CAF, HMB e TCS. A título de exemplo, mostra-se na Figura 4.14 e anexo, um cromatograma de exsudação/dessorção da espécie de planta *H. portulacoides* que evidencia os compostos em análise, assim como, os respetivos espectros obtidos.

Segundo a literatura, a escolha das plantas é também uma questão importante, uma vez que a atividade metabólica da planta liberta oxigénio na rizosfera, o que ajuda na nitrificação através da absorção direta de nutrientes. Por sua vez, o acesso e disponibilidade de nutrientes afetam a resposta da planta em termos de crescimento e alocação de recursos, facto que vai influenciar a eficiência de remoção nas zonas estuarinas (Zhang *et al.*, 2013a). No presente estudo, apesar das diferenças de remediação entre as espécies não terem sido significativas, é de salientar que os seus sistemas radiculares apresentam características diferentes (morfologia e fisiologia). Mesmo dentro da mesma espécie, a biomassa poderá influenciar o processo de remoção dos contaminantes. Segundo Carvalho *et al.* (2012) uma maior percentagem de biomassa corresponde a uma maior percentagem de remoção. Nesta sequência pode-se inferir que os valores de remediação tanto para a *S. maritima* como para a *H. portulacoides* poderiam ser superiores entre Julho e Setembro ou Janeiro e Março (quando se verificam os maiores valores de biomassa subterrânea) em relação à época em estudo, Outubro e Novembro. Para além da biomassa, é conhecido que a temperatura e a sua relação com a sazonalidade, pode ser importante para a eliminação de alguns PPCPs em zonas húmidas. Por exemplo, a fração orgânica presente no sedimento no Verão é superior à encontrada no Inverno (Dordio *et al.*, 2010; Caçador *et al.*, 2000). Segundo Hijosa-Valsero *et al.* (2010) temperaturas mais elevadas representam um aumento significativo na remoção de PPCPs, principalmente da CAF, devido ao aumento da taxa de biodegradação.

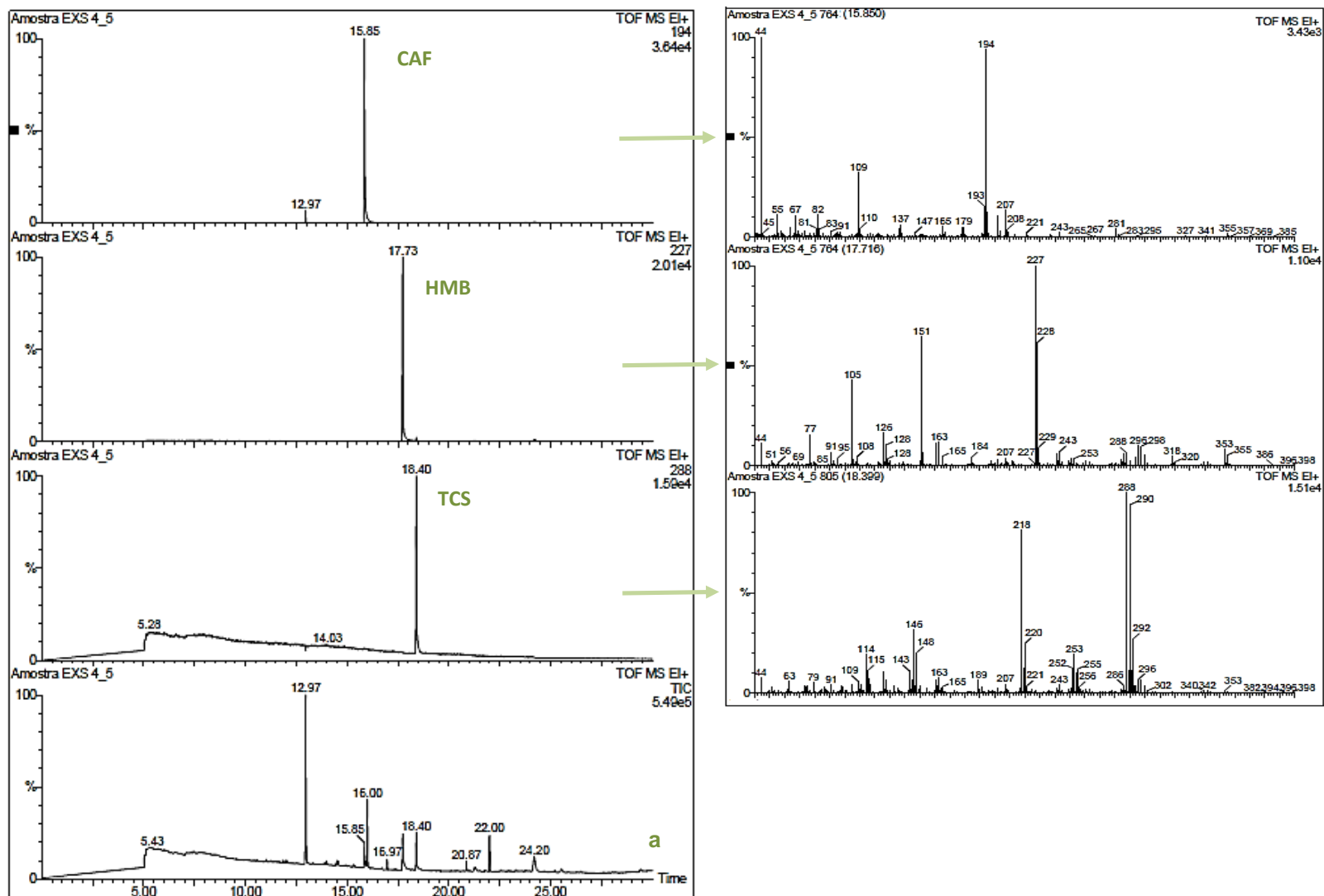


Figura 4.14 - Cromatogramas obtidos por GC-TOF/MS para uma amostra de exsudação/dessorção da planta (a) com **extração de iodo** (à esquerda): 194 correspondente à CAF, 277 à HMB e 288 ao TCS e respectivos **espectros de massa** (à direita).

Por fim, é importante referir que a presença simultânea de uma variedade de contaminantes, pode restringir os processos de fitorremediação. Com efeito, a resposta das plantas ao ambiente químico envolvente, nomeadamente em termos de absorção e acumulação, e a disponibilidade dos contaminantes pode ter sido influenciada pela presença simultânea de diferentes compostos químicos, como aconteceu no caso de contaminantes orgânicos e metais (Almeida *et al.*, 2009). No caso do elutriado com sedimento (ES), a fração líquida e o sedimento, não sofreram qualquer processo de limpeza, proporcionando uma simulação do meio natural que podendo esta conter outros compostos que poderão influenciar/mascarar a remediação, como é o caso dos HAPs encontradas na matriz estuarina.

Capítulo 5 – Conclusões

Devido à contaminação de PPCPs nos sistemas aquáticos torna-se relevante a procura de soluções eficientes, económicas e que causem o mínimo distúrbio no processo de remediação. Este estudo, além de ter permitido verificar o potencial de remediação das espécies *S. maritima* e *H. portulacoides* permitiu observar o modo como os PPCPs se podem dispersar no ambiente natural. Os resultados obtidos nas experiências laboratoriais mostraram que os contaminantes em estudo: CAF, HMB e TCS, se movimentaram para diferentes compartimentos estuarinos (água, sedimento e planta). O ensaio em solução de *Hoagland* permitiu constatar que a radiação solar influencia a remoção de HMB e, principalmente, de TCS. No ensaio B, a CAF devido à sua solubilidade e Log K_{ow} , permaneceu maioritariamente na fração líquida e foi pouco remediada sob a ação das plantas. Pelo contrário, a HMB e o TCS, sofreram diferentes mecanismos de remediação/compartimentação ambiental: fotodegradação, bio-/rizorremediação, adsorção ao sedimento e à raiz. Quanto ao desempenho das duas plantas estudadas, as suas *performances* foram semelhantes, contudo as suas características (morfológicas e fisiológicas) poderão ser um fator determinante na escolha da espécie a aplicar em futuros trabalhos de remediação.

Capítulo 6 - Perspetivas futuras

Devido à descarga contínua de efluentes nos sistemas aquáticos torna-se relevante atuar a montante do problema da contaminação estuarina, ou seja, diminuir a emissão de PPCPs dos efluentes das ETARs. A eliminação destes compostos na ETAR resulta de um conjunto de processos complexos que se têm baseado preferencialmente na remoção de outro tipo de contaminantes (p.e. metais) e elementos (p.e. fósforo), em parte explicado pela ausência de legislação para PPCPs específicos.

Uma linha de investigação estará relacionada com o estudo de mecanismos de dispersão ou remediação dos contaminantes em leitos de macrófitas, como passo de polimento do tratamento biológico nas ETARs. A análise dos tecidos vegetais e características da comunidade microbiana, com o objetivo de estudar o mecanismo de remoção dos contaminantes, também se poderá revelar de interesse.

Para fazer face à contaminação já presente em estuários de todo o mundo é necessário partir para trabalhos à escala de campo para verificar a adequabilidade do processo em condições reais. Técnicas co-adjuvantes como bioaumento e bioestímulo poderão ser consideradas, numa primeira fase em laboratório e, posteriormente, em escala de campo. Por outro lado, acoplar a fitorremediação a um processo físico-químico, como por exemplo, o processo electrocinético poderá aumentar a disponibilidade dos contaminantes orgânicos e estimular a comunidade microbiana. Tendo em conta os resultados obtidos na presente matriz com mistura de contaminantes orgânicos (HAPs) os sedimentos poderão estar também contaminados com metais, como descrito em trabalhos recentes da literatura (secção Enquadramento). Assim, fará sentido estudar as interações entre misturas de contaminantes, p.e. PPCPs – HAPs – metais.

Referências bibliográficas

- Abhilash, P.C., Jamil, S., Singh, N., 2009. Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnol. Adv.* **27**, 474–88.
- Abreu C. S. V., 2008. Electro-remediação de solos contaminados com pesticidas: caso da bentazona. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. **6**, 39-40.
- Aga A., 2008. Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems. Taylor & Francis Group, LLC. CRC Press. 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300.
- Alkorta, I., Garbisu, C., 2001. Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresour. Technol.* **79**, 273–6.
- Almeida, C.M., Mucha, A.P., Vasconcelos, M.T., 2004. Influence of the sea rush *Juncus maritimus* on metal concentration and speciation in estuarine sediment colonized by the plant. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 3112-3118.
- Aufiero M., Butler C., Jaser J., 2012. An Analysis of Methods for Detecting Triclosan and Removal of Triclosan from Water Using Activated Carbon and Zeolites. Major Qualifying Project completed in partial fulfillment of the Bachelor of Science Degree at Worcester Polytechnic Institute, Worcester, MA.
- Barceló, J., Poschenrieder, C., 2003. Phytoremediation : principles and perspectives. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona. *Contr. Sc.* **2**, 333–344.
- Bila D., Dezotti M., 2003. Pharmaceutical drugs in the environment. COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro. *Quim. Nova.* **26**, 523-530.
- Blair, B.D., Crago, J.P., Hedman, C.J., Klaper, R.D., 2013. Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. *Chem.* **93**, 2116–23.
- Buerge, I.J., Poiger, T., Müller, M.D., Buser, H.R., 2003. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 691–700.
- Burke, D.J., Weis, J.S., Weis, P., 2000. Release of metals by the leaves of the salt marsh grasses *Spartina alterniflora* and *Phragmites australis*. *Estuar. Coast. Shelf S.* **51**, 153–159.
- Caçador, I., Vale, C., Catarino, F., 2000. Seasonal variation of Zn, Pb, Cu and Cd concentrations in the root-sediment system of *Spartina maritima* and *Halimione portulacoides* from Tagus estuary salt marshes. *Mar. Environ. Res.* **49**, 279–90.
- Carvalho, P.N., Araújo, J.L., Mucha, A.P., Basto, M.C.P., Almeida, C.M.R., 2013. Potential of constructed wetlands microcosms for the removal of veterinary pharmaceuticals from livestock wastewater. *Bioresour. Technol.* **134**, 412–6.
- Carvalho, P.N., Basto M. C. P., Almeida C. M. R., 2012. Potential of *Phragmites australis* for the removal of veterinary pharmaceuticals from aquatic media. *Bioresour. Technol.* **116**, 497-501.
- Carvalho, P.N., Basto, M.C.P., Silva, M.F.G.M., Machado, A., Bordalo, A.A., Vasconcelos, M.T.S.D., 2010. Ability of salt marsh plants for TBT remediation in sediments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **17**, 1279–1286.

- Couto, M.N.P.F.S., Basto, M.C.P., Vasconcelos, M.T.S.D., 2011. Suitability of different salt marsh plants for petroleum hydrocarbons remediation. *Chem.* **84**, 1052–7.
- Cunningham, S.D., Ow, D.W., 1996. Promises and Prospects of Phytoremediation. *Plant Physiol.* **110**, 715–719.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., 1993. Remediation of contaminated soils with green plants : an overview. *Tissue Culture Association. In Vitro Cell. Dev. Biol.* **29**, 207–212.
- Daughton, C.G., Ternes, T. a, 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* **107**, 907–938.
- Díaz-Cruz, M.J., Lopez de Alda, M.J., Barcelo, D., 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends Anal. Chem.* **22**, 340–351.
- Dietz, a C., Schnoor, J.L., 2001. Advances in phytoremediation. *Environ. Health Perspect.* **109**, 163–8.
- Dordio, A., Carvalho, a J.P., Teixeira, D.M., Dias, C.B., Pinto, A.P., 2010. Removal of pharmaceuticals in microcosm constructed wetlands using *Typha* spp. and LECA. *Bioresour. Technol.* **101**, 886–92.
- Douglas, H., Rats, A., 2007. Fitorremediação : Considerações Gerais e Características de Utilização. **15**, 103–117.
- Duarte, B., Delgado, M., Caçador, I., 2007. The role of citric acid in cadmium and nickel uptake and translocation, in *Halimione portulacoides*. *Chem.* **69**, 836–40.
- Eapen, S., Singh, S., D'Souza, S.F., 2007. Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. *Biotechnol. Adv.* **25**, 442–51.
- Fediuc, E., Erdei, L., 2002. Physiological and biochemical aspects of cadmium toxicity and protective mechanisms induced in *Phragmites australis* and *Typha latifolia*. *J. Plant Physiol.* **159**, 265–271.
- Fent, K., Kunz, P.Y., Zenker, A., Rapp, M., 2010. A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. *Mar. Environ. Res.* **69**, 4–6.
- Fent, K., Weston, A. a, Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* **76**, 122–59.
- Fifield, F. W., Kealey, D. 2000. Principles and Practice of Analytical Chemistry. 5th Edition, Blackwell Science Ltd. **4**, 73-80.
- Gomes, H.I., 2012. Phytoremediation for bioenergy: challenges and opportunities. *Environ. Technol. Rev.* **1**, 59–66.
- Greger, M., 2004. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. In: Prasad, M.N.V. (Ed.), *Heavy Metal Stress in Plants – From Biomolecules to Ecosystems*, second ed. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, Germany. 1–27.
- Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* **131**, 5–17.
- Hennion, M.C., 1999. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **856**, 3–54.

Hijosa-Valsero, M., Matamoros, V., Sidrach-Cardona, R., Martín-Villacorta, J., Bécares, E., Bayona, J.M., 2010. Comprehensive assessment of the design configuration of constructed wetlands for the removal of pharmaceuticals and personal care products from urban wastewaters. *Water Res.* **44**, 3669-3678.

ISO 8466-1 (1990). "Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function", International Organization for Standardization, Genève.

Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 1202–11.

Koppolu L., Agblevor F.A., and Clements L. D., 2003. Pyrolysis as a technique for separating heavy metals from hyperaccumulators. Part II: Lab-scale pyrolysis of synthetic hyperaccumulator biomass, *Biomass Bioenerg.* **25**, 651–663.

Kümmerer, K., 2004. Pharmaceuticals in the Environment – Scope of the Book and Introduction. **1**, 527.

Le Minh N., Khan S. J., Drewes J. E., Stuetz R.M., 2010. Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Res.* **44**, 4295–323.

Lee, S., Kang, S., Lim, J., Huh, Y.J., Kim, K., Cho, J., 2011. Evaluating controllability of pharmaceuticals and metabolites in biologically engineered processes, using corresponding octanol-water distribution coefficient. *Ecol. Eng.* **37**, 1595-1600.

Lichtenthaler H. K. & Wellburn A. R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. Meeting, Liverpool. **11**.

Lindström, A., Buerge, I.J., Poiger, T., Bergqvist, P. A., Müller, M.D., Buser, H. R., 2002. Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 2322–9.

Loraine, G. A., Pettigrove, M.E., 2006. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 687–95.

Magi, E., Di Carro, M., Scapolla, C., Nguyen, K.T.N., 2012. Stir Bar Sorptive Extraction and LC–MS/MS for Trace Analysis of UV Filters in Different Water Matrices. *Chromatographia* **75**, 973–982.

Martins V. C. M., 2011. Comunidade bacteriana endofítica cultivável de *Halimione portulacoides*. Dissertação. Universidade de Aveiro – Departamento de Biologia.

Matamoros, V., Nguyen, L.X., Arias, C.A., Salvadó, V., Brix, H., 2012a. Evaluation of aquatic plants for removing polar microcontaminants: a microcosm experiment. *Chem.* **88**, 1257-1264.

Matamoros, V., Salvadó, V., 2012b. Evaluation of the seasonal performance of a water reclamation pond-constructed wetland system for removing emerging contaminants. *Chem.* **86**, 111-117.

Matamoros, V., Arias, C., Brix, H., Bayona, J.M., 2009. Preliminary screening of small-scale domestic wastewater treatment systems for removal of pharmaceutical and personal care products. *Water Res.* **43**, 55–62.

- Matamoros, V., Arias, C., Brix, H., Bayona, J.M., 2007. Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from urban wastewater in a pilot vertical flow constructed wetland and a sand filter. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 8171-8177.
- McCutcheon S. C., Schnoor J. L., 2003. *Phytoremediation - Transformation and control of contaminants*. Wiley-Interscience, Hoboken,NJ.
- McLusky D. S., Elliot M., 2004. *The Estuarine Ecosystem: Ecology, Threats and Management*. Oxford University Press.**1**, 1-18.
- Meagher, R.B., 2000. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 153–62.
- Tatarazako N., Ishibashi H., Teshima K., Kishi K., Arizono K., 2004. Effects of triclosan on various aquatic organisms. *Environ. Sci.***11**, 133–140.
- Newman, L. a, Reynolds, C.M., 2004. Phytodegradation of organic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 225–30.
- Pereira, P., Caçador, I., Vale, C., Caetano, M., Costa, A.L., 2007. Decomposition of belowground litter and metal dynamics in salt marshes (Tagus Estuary, Portugal). *Sci. Total Environ.* **380**, 93–101.
- Pietrogrande, M.C., Basaglia, G., 2007. GC/MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices. *TrAC Trends Anal. Chem.* **26**, 1086–1094.
- Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**, 15–39.
- Pubchem, 2014. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- Queiroz, S. 2001. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica, *Química Nova.* **24**, 68-76.
- Reboreda, R., Caçador, I., 2007a. Copper, zinc and lead speciation in salt marsh sediments colonised by *Halimione portulacoides* and *Spartina maritima*. *Chem.* **69**, 1655–61.
- Reboreda, R., Caçador, I., 2007b. Halophyte vegetation influences in salt marsh retention capacity for heavy metals. *Environ. Pollut.* **146**, 147–54.
- Redshaw, C.H., Wootton, V.G., Rowland, S.J., 2008. Uptake of the pharmaceutical Fluoxetine Hydrochloride from growth medium by Brassicaceae. *Phytochemistry.* **69**, 2510–6.
- Reichenauer, T.G., Germida, J.J., 2008. Phytoremediation of organic contaminants in soil and groundwater. *ChemSusChem.* **1**, 708–17.
- Reinhold, D., Vishwanathan, S., Park, J.J., Oh, D., Michael Saunders, F., 2010. Assessment of plant-driven removal of emerging organic pollutants by duckweed. *Chem.* **80**, 687–92.
- Richardson, B.J., Lam, P.K.S., Martin, M., 2005. Emerging chemicals of concern: pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China. *Mar. Pollut. Bull.* **50**, 913–20.
- Rosa, G. S., 2006. Avaliação do potencial de espécies vegetais na fitorremediação de solos contaminados por petróleo. Dissertação em Engenharia Ambiental. Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente. Faculdade de Engenharia. Centro de Tecnologia e Ciências.

Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I., 1998. Phytoremediation. *Plant Physiol. Plant Mol. Bio.* **68**, 49-643.

Sas-Nowosielska, R. Kucharski, E. Malkowski, M. Pogrzeba, J.M. Kuperberg, and K. Krynski, 2004. Phytoextraction crop disposal – an unsolved problem, *Environ. Pollut.* **128**, 373–379.

Schnoor, J.L., Licht, L. a, McCutcheon, S.C., Wolfe, N.L., Carreira, L.H., 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 318-23.

Shenker, M., Harush, D., Ben-Ari, J., Chefetz, B., 2011. Uptake of carbamazepine by cucumber plants--a case study related to irrigation with reclaimed wastewater. *Chem* **82**, 905–10.

Sigma-Aldrich Co., 1998. Guide to Solid Phase Extraction. [Documento na Internet] Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>

Somenath, M., 2003. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. Wiley Interscience, New Jersey. **2**, 78-113.

Sousa, A.I., Caçador, I., Lillebø, A.I., Pardal, M. a, 2008. Heavy metal accumulation in *Halimione portulacoides*: intra- and extra-cellular metal binding sites. *Chem.* **70**, 850–7.

Stottmeister, U., Wiebner, A., Kusch, P., Kappelmeyer, U., Kästner, M., Bederski, O., Müller, R.A., Moormann, H., 2003. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnol. Adv.* **22**, 93-117.

Sun, Q., Lv, M., Hu, A., Yang, X., & Yu, C.-P., 2013. Seasonal variation in the occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products in a wastewater treatment plant in Xiamen, China. *J. Hazard. Mater.* **20**, 1-7.

Susarla, S., Medina, V.F., McCutcheon, S.C., 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.* **18**, 647–658.

Teixeira A. R. N., Valente I. A. M. A., Cardoso J. P. M. A., Francisco M. E. S. M., 2006. Caracterização química de extratos obtidos a partir de plantas silvestres portuguesas (*Spartina maritima*). Relatório de estágio. Universidade Nova de Lisboa – Unidade de Biotecnologia Ambiental – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Monte de Caparica.

Ternes, T.A., Bonerz, M., Schmidt, T., 2001. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **398**, 175–185.

Thomas, K. V, Hilton, M.J., 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* **49**, 436–44.

US Environmental Protection Agency, 2008. Green Remediation: Incorporating Sustainable Environmental Practices into Remediation of Contaminated Sites, Office of Solid Waste and Emergency Response, US Environmental Protection Agency, Washington.

US Environmental Protection Agency, 2000. Introduction to Phytoremediation, Office of Research and Development, National Risk Management Research Laboratory, US Environmental Protection Agency, Ohio.

US Environmental Protection Agency, 1991. Evaluation of Dredged Material Proposed for Ocean Disposal. Washington, DC, USA.

Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Zambello, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment--a review. *Sci. Total Environ.* **429**, 123–55.

Vione, D., Caringella, R., De Laurentiis, E., Pazzi, M., Minero, C., 2013. Phototransformation of the sunlight filter benzophenone-3 (2-hydroxy-4-methoxybenzophenone) under conditions relevant to surface waters. *Sci. Total Environ.* **463:464**, 243–51.

WFD-UKTAG - Water Framework Directive - United Kingdom Technical Advisory Group, 2009. Proposed EQS for Water Framework Directive Annex VIII substances: triclosan (*For consultation*). Scotland.

Williams, J.B., 2002. Phytoremediation in Wetland Ecosystems: Progress, Problems, and Potential. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **21**, 607–635.

Ying GG, Kookana RS. 2007. Triclosan in wastewaters and biosolids from Australian wastewater treatment plants. *Environ Int.* **33**, 199–205.

Zarate Jr., F.M., Schulwitz, S.E., Stevens, K.J., Venables, B.J., 2012. Bioconcentration of triclosan, methyl-triclosan, and triclocarban in the plants and sediments of a constructed wetland. *Chem.* **88**, 323-329.

Zhang, D., Gersberg, R.M., Ng, W.J., Tan, S.K., 2013a. Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. *Environ. Pollut.* 1-20.

Zhang, D.Q., Hua, T., Gersberg, R.M., Zhu, J., Ng, W.J., Tan, S.K., 2013b. Fate of caffeine in mesocosms wetland planted with *Scirpus validus*. *Chem.* **90**, 1568–72.

Zhao, J.-L., Ying, G.-G., Liu, Y.-S., Chen, F., Yang, J.-F., Wang, L., 2010. Occurrence and risks of triclosan and triclocarban in the Pearl River system, South China: from source to the receiving environment. *J. Hazard. Mater.* **179**, 215–22.

Ziylan A., Ince N. H., 2011. The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: treatability by conventional and non-conventional processes. *J Hazard Mater.* **187**, 24–37.

ANEXO

Suplemento dos espectros de massa da cafeína, oxibenzona e triclosan

